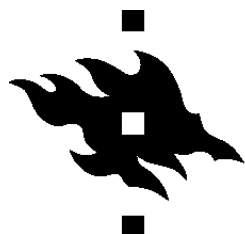


Solunulkoisten vesikkelien pinnalle muodostuvan proteiinikoronan tutkimusmenetelmien kehittäminen

Elina Niemeläinen



HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

Pro gradu -tutkielma
Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta
Molekyylibiotieteiden koulutusohjelma
Biokemia / Terveystieteet

Tammikuu 2020

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Molekyylibiotieteiden koulutusohjelma	
Tekijä – Författare – Author Elina Niemeläinen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Solunulkoisten vesikkelien pinnalle muodostuvan proteiinikoronan tutkimusmenetelmien kehittäminen			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Biokemia / Terveystieteiden biotieteet			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year 01 / 2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 53
Tiivistelmä – Referat – Abstract Solunulkoiset vesikkelit (EV:t) ovat lipidikalvon rajaamia nanokokoisia partikkeleita, joita esiintyy luonnostaan kaikissa kehon nesteissä. EV:t ovat osa elimistön normaalia toimintaa, ja ne voivat kuljettaa sisällään muun muassa proteiineja, RNA:ta ja lipidejä solujen välillä. Tämän vuoksi EV:illä on sovellusmahdollisuuksia esimerkiksi lääkeaineiden kuljettajina. Kun nanopartikkelit joutuvat tekemisiin veriplasman kanssa, niiden pinnalle muodostuu plasmaproteiinin rakenne, jota kutsutaan proteiinikoronaksi. Proteiinikoronan muodostuminen on dynaaminen prosessi, ja proteiinit sitoutuvat proteiinikoronaan riippuen niiden affiniteettista nanopartikkeleiden pintaan. Kun nanopartikkeleita halutaan annostella elimistöön, proteiinikoronalla on suuri vaikutus niiden puoliintumisaikaan ja soluunottoon. Tämän työn tarkoituksena oli tutkia veriplasman vaikutuksesta PC-3 -solujen erittämien EV:iden pinnalle muodostuvaa proteiinikoronaa, sekä tutkia menetelmiä proteiinikoronan eristämiseen. Aluksi tuorepakastetusta plasmasta poistettiin EV:t ja lipoproteiinipartikkelit suodattamalla. Tätä suodatettua plasmata inkuboitiin yhdessä EV:iden kanssa, minkä jälkeen vapaiden plasmaproteiinien poistoa kokeiltiin ultrafiltraatiolla. Plasmaproteiinien poistoa kokeiltiin myös geelisuodatuksella (SEC). Syntyneitä EV-proteiinikorona -komplekseja tarkasteltiin sitten SDS-PAGE:lla. EV:t karakterisoitiin nanopartikkelien jäljitysanalyysillä ja western blot -analyysillä. Näistä kahdesta käytetystä menetelmästä, SEC vaikutti käytännöllisemmältä ja tehokkaammalta keinolta vapaiden plasmaproteiinien erottamiseksi EV-proteiinikorona -kompleksista. Menetelmä vaatii kuitenkin vielä lisää kehittämistä ja testausta, jotta se toimisi moitteettomasti.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Solunulkoiset vesikkelit, EV, proteiinikorona, veriplasma, ultrafiltraatio, geelifiltraatio, SEC			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Heikki Saari ja Marjo Yliperttula			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Department of Biosciences	
Tekijä – Författare – Author Elina Niemeläinen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Developing research methods to investigate protein corona around extracellular vesicles			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Biochemistry / Health biosciences			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu (Master's thesis)	Aika – Datum – Month and year 01 / 2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 53	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Extracellular vesicles (EVs) are lipid bilayer-enclosed nano-sized particles that are found in all body fluids. EVs are part of normal cell functions and they can carry for example proteins, RNA and lipids between cells. This makes them potential candidates as drug delivery vehicles.</p> <p>When nanoparticles are introduced to blood plasma, a plasma protein structure is formed on their surface, called the protein corona. The formation of a protein corona is a dynamic process, and the proteins are binding to the corona depending on their affinity to the nanoparticle surface. When administrating nanoparticles to cells, protein corona has a big impact on the half-life and cellular uptake of the particles.</p> <p>The aim of this work was to study the plasma protein corona of PC-3 derived EVs, and to investigate methods for protein corona isolation. First, EVs and lipoprotein particles were removed from fresh frozen plasma by membrane filtration. Using this filtrated plasma, we then tested plasma-EV incubation and removing of free plasma proteins by simple ultrafiltration. Removing of free plasma proteins was also examined by size-exclusion chromatography (SEC). The resulting EV-protein corona complex was visualized with SDS-PAGE. EVs were characterized with nanoparticle tracking analysis and western blotting.</p> <p>Of these two methods used, SEC appeared to be more convenient and efficient way to remove the free plasma proteins from the EV-protein corona complex. The method still requires further development and testing in order to perform optimally.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Extracellular vesicles, EV, protein corona, blood plasma, ultrafiltration, size-exclusion chromatography, SEC			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Heikki Saari ja Marjo Yliperttula			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO	7
2 SOLUNULKOISET VESIKKELIT	7
2.1 Solunulkoiset vesikkelit sairauksissa ja niiden terapeuttinen potentiaali	8
2.2 Menetelmät solunulkoisten vesikkeliä tutkimuksessa	10
2.2.1 Solunulkoisten vesikkeliä eristämiseen käytetyt menetelmät	10
2.2.2 Solunulkoisten vesikkeliä karakterisointiin käytetyt menetelmät	12
3 PROTEIINIKORONA	14
3.1 Perinteisesti käytetyt proteiinikoronan analysointimenetelmät	15
3.2 Proteiinikoronan vaikutus nanopartikkelien biologiseen tehokkuuteen	16
3.3 Pehmeä proteiinikorona	17
3.4 Proteiinikoronan tulevaisuuden käyttömahdollisuudet	18
4 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	19
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	20
5.1 Tutkimuksen pääpiirteet	20
5.2 Solunulkoisten vesikkeliä tuottaminen	21
5.3 Solunulkoisten vesikkeliä eristäminen ja puhdistus	22
5.4 Näytteissä olevien partikkelien määrän ja kokojakauman karakterisointi	22
5.5 Veriplasma ja sen suodatus	23
5.6 Solunulkoisten vesikkeliä proteiinikoronan eristäminen	24
5.6.1 Vivaspin-ultrafiltraatio	24
5.6.2 Geelifiltraatio	25
5.7 Näytteiden proteiinipitoisuuden määrittäminen	26
5.8 Näytteiden proteiiniprofiilin analyysi: SDS-PAGE	26
5.9 Vesikkeliä näytteiden karakterisointi western blot -analyysillä	27
6 TULOKSET	29
6.1 Käytettyjen EV-kantaliuosten karakterisointi	29
6.2 Vivaspin-suodatettu plasma	31
6.3 Proteiinikoronan eristäminen Vivaspin-ultrafiltraatiolla	34
6.3.1 Solunulkoisten vesikkeliä Vivaspin-suodatuksen testaaminen	34
6.3.2 Proteiinikoronan eristäminen Vivaspin-ultrafiltraatiolla	34
6.4 Proteiinikoronan eristäminen geelifiltraatiolla	36
7 TULOSTEN TARKASTELU	40
7.1 EV:iden karakterisointi	40
7.2 Vivaspin-suodatettu plasma vastaa proteiiniprofiililtaan suodattamatonta plasmaa	40

7.3 Solunulkoisten vesikkelit jäävät kiinni Vivaspin-suodattimeen	41
7.4 Vivaspin-ultrafiltraatiolla ei pystytty eristämään proteiinikoronaa	42
7.5 Geelifiltraatio toimi paremmin EV:iden proteiinikoronan eristämiseen	43
7.6 Yleistä pohdintaa geelifiltraatiosta	45
8 YHTEENVETO.....	47
9 KIITOKSET	48
10 VIITELUETTELO	49

LYHENNELISTA

AF4	Asymmetrinen poikittaisvirtauskenttävirtausfraktiointi, asymmetric flow field-flow fractionation
BSA	Naudan seerumin albumiini, bovine serum albumin
DLS	Dynaaminen valonsironta, dynamic light scattering
EV	Solunulkoinen vesikkeli, extracellular vesicle
HDL	Veren lipoproteiini, high-density lipoprotein
HSP70	Lämpöshokkiproteiini 70, heat shock protein 70
LDL	Veren lipoproteiini, low-density lipoprotein
NTA	Nanopartikkeleiden jäljitysanalyysi, nanoparticle tracking analysis
PBS	Fosfaatti-puskuroitu suolaliuos, phosphate-buffered saline
PC-3	Eturauhassyöpäsolulinja
SEC	Geelifiltraatio, size exclusion chromatography
TEM	Läpäisyelektronimikroskooppi, transmission electron microscope.
TSG101	Kasvaimelle herkistävä proteiini 101, tumor susceptibility gene 101
VLDL	Veren lipoproteiini, very low-density lipoprotein

1 JOHDANTO

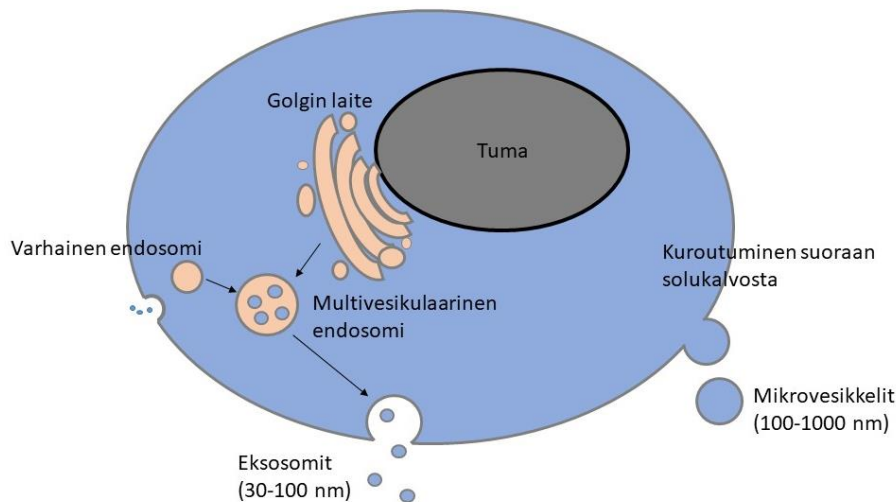
Solunulkoiset vesikkelit eli EV:t (extracellular vesicles) ovat elimistössä luonnostaan esiintyviä lipidikalvon rajaamia nanokokoisia partikkeleita, jotka toimivat muun muassa solujen välisinä kuljetus- ja kommunikaatiovälineinä (van der Pol ym. 2012; Armstrong ja Stevens 2018). Tämä tekee niistä mielenkiintoisen vaihtoehdon lääkeaineiden kuljettimeksi erityisesti sellaisille lääkkeille, joiden biologinen hyötyosuus on sellaisenaan huono. Kun EV:t injektoidaan elimistöön, niiden pinnalle muodostuu kehonnesteen proteiineista koostuva proteiinikorona (Nierenberg ym. 2018). Proteiinikoronalla on merkittävä vaikutus siihen, kuinka nanopartikkeli pääsee vaikuttamaan kehossa (Caracciolo ym. 2018): proteiinikorona saattaa estää (Caracciolo ym. 2018) tai parantaa (Leibe ym. 2019) pääsyä soluihin, ja siten vaikuttaa partikkelin lääkeaineiden kuljetustehokkuuteen. Tästä syystä partikkelien proteiinikoronan tutkiminen ja proteiinikoronan tutkimusmenetelmien kehittäminen on tärkeää.

Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia EV:iden pinnalle veriplasman vaikutuksesta muodostuvaa proteiinikoronaa sekä kehittää proteiinikoronan tutkimiseen sopivia menetelmiä. PC-3 -soluilla tuotettuja ja puhdistettuja EV:itä inkuboitiin plasmassa, minkä jälkeen EV:t erotettiin plasman vapaista proteiineista käyttäen kahta eri menetelmää: ultrafiltraatiota ja geelifiltraatiota.

2 SOLUNULKOISET VESIKKELIT

EV:t vaihtelevat paljon muun muassa kokonsa, proteiini- ja lipidikoostumuksensa puolesta, mistä johtuen niiden tarkempi jaottelu ja nimeäminen on pitkään ollut epäselvää: EV:istä on vaihtelevasti käytetty muun muassa nimityksiä eksosomi, ektosomi, mikrovesikkeli, mikropartikkeli, prostasomi ja onkosomi (Lötvall ym. 2014). Nykyään EV:t jaotellaan useimmiten kolmeen ryhmään niiden syntyvän ja koon mukaan (van der Pol ym. 2012; Szatanek ym. 2017): eksosomit ovat halkaisijaltaan 30-100 nm kokoisia vesikkeleitä, jotka vapautuvat solun ulkopuolelle multivesikuläarisestä endosomista (kuva 1). Mikrovesikkelit taas ovat 100-1000 nm kokoisia, ja ne kuroutuvat solunulkoiseen tilaan suoraan solukalvosta (kuva 1). Kolmantena ryhmänä ovat apoptoottiset kappaleet, jotka erittyvät apoptoosia läpikäyvistä soluista. Nämä vesikkelit ovat kooltaan huomattavasti suurempia (500-5000 nm) ja sisältävät geneettistä materiaalia sekä soluelimiä. Koska apoptoottiset kappaleet eroavat luonteeltaan huomattavasti

muista solunulkoisista vesikkeleistä, tutkimuksissa keskitytään usein eksosomeihin ja mikrovesikkeleihin. On kuitenkin tärkeää huomioida, että eksosomeja ja mikrovesikkeleitä ei ole mahdollista täysin eristää toisistaan, sillä niiden kokoluokat ovat niin lähellä toisiaan.



Kuva 1. Eksosomien ja mikrovesikkelien muodostuminen. Eksosomit vapautuvat solunulkoiseen tilaan multivesikulaarisesta endosomista, kun taas mikrovesikkelit kuroutuvat solunulkoiseen tilaan suoraan solukalvosta (van der Pol ym. 2012; Szatanek ym. 2017).

2.1 Solunulkoiset vesikkelit sairauksissa ja niiden terapeuttinen potentiaali

EV:t esiintyvät luonnostaan useimmissa kehonesteissä, ja ne ovat osa kehon solujen normaalia toimintaa (van der Pol ym. 2012). EV:iden on osoitettu osallistuvan muun muassa solujen väliseen kommunikaatioon, immuunireaktioihin ja erilaisiin signaalikaskadeihin. EV:t ovat osallisina sekä normaalissa fysiologiassa että patologisissa prosesseissa, minkä vuoksi EV:illä on potentiaalisia sovelluksia niin biomarkkereina, terapeuttisina aineina kuin lääkkeiden kuljettimina.

EV:illä on potentiaalia tautien diagnostiikassa biomarkkereina. On esimerkiksi osoitettu, että eri munasarjasyöpäsolut erittävät eri lailla EV:itä: eräässä tutkimuksessa todettiin, että eritettyjen EV:iden määrä ja niiden RNA-sisältö erosivat kahden eri munasarjasyöpäsolulinjan välillä, ja ne korreloivat syövän aggressiivisuuden kanssa (Kobayashi ym. 2014). Toisessa tutkimuksessa taas havaittiin, että suuri osa tutkimuksessa käytetyistä munasarjasyöpäsoluista eritti eksosomeissaan klaudiinia, jota on mahdollista käyttää munasarjasyövän biomarkkerina (Li ym.

2009). EV:iden ja niiden sisällön analysointia voitaisiin näin ollen mahdollisesti käyttää esimerkiksi munasarjasyövän diagnosoimiseen ja sairauden etenemisen seuraamiseen. EV:itä on tutkittu myös elinsiirtojen hyljintäreaktion seurannan välineeksi (Vallabhajosyula ym. 2017): sekä siirre-EV:iden määrän että niiden sisällön on osoitettu muuttuvan siirtoelimen hyljinnän seurauksena. Siirre-EV:iden käytön etuna on erityisesti se, että ne voidaan analysoida epäinvasiivisesti, jolloin hyljintäreaktion pitkäaikainenkin seuranta olisi helppoa.

EV:iden on osoitettu kuljettavan erilaisia viestimolekyylejä solujen välillä (van der Pol ym. 2012; Armstrong ja Stevens 2018). Koska EV:t kuljettavat luonnostaan erilaisia biomolekyylejä, myös lääkeaineproteiinien sekä terapeuttisen RNA:n ja DNA:n pakkaaminen EV:iden kalvon sisään oletetaan olevan mahdollista. Tästä syystä EV:itä on alettu tutkia mahdollisena lääkkeiden kuljettimena: helposti hajoavat tai muuten herkäät lääkeaineet voitaisiin pakata vesikkelin kaksoiskalvon suojaan, ja kuljettaa kohdesoluun. Esimerkiksi syöpälääke paklitakselin käyttöä rajoittaa sen huono biologinen hyötyosuus, heikko vesiliukoisuus sekä suuri ensikierron metabolia (Ezrahi ym. 2019). Saari ym. (2015) totesivat tutkimuksessaan, että paklitakselin pakkaaminen EV:iden sisään muutti lääkkeen soluunottoa sekä tehosti sen sytotoksisuutta. EV:iden käyttö lääkemolekyylien kuljettimena tehostaa myös muiden nanopartikkelien vaikutusta kehossa: juuri julkaistussa artikkelissa (Yong ym. 2019) todettiin, että syöpälääke dokso-rubisiinilla ladatun silikapartikkelin pakkaaminen eksosomin sisään parantaa partikkelin soluunottoa ja sytotoksisuutta. Myös muilla vesikkeleihin lastatuilla lääkeaineilla on todettu terapeuttisia vaikutuksia: anti-inflammatorisen kurkumiinin pakkaaminen vesikkelin sisään havaittiin parantavan molekyylin stabiiliutta ja kulkeutumista aivoihin, kun se annosteltiin intranasalisesti (Zhuang ym. 2011). Tämän tyyppinen lähestyminen tarjoaa mahdollisuuksia lääkkeiden spesifisemmälle kohdentamiselle keskushermostoon sekä epäinvasiiviselle lääkeannostelulle, joka sopisi erityisesti lääkeaineille, joiden biologinen hyötyosuus suun kautta annosteltuna on huono.

EV:iden tarjoama potentiaali lääkkeiden kuljettimena on inspiroinut myös uusien EV-pohjaisten kuljettimien kehitystä (Jang ym. 2013; Kailashiya ym. 2019). Uusilla menetelmillä on pyritty parantamaan erityisesti partikkelien tuotantoa sekä vähentämään syöpälääkkeiden haittavaikutuksia lääkkeen paremman kohdentamisen avulla. Esimerkiksi eksosomin-kaltaisia nanovesikkeleitä on tuotettu monosyyteistä puristamalla ne suodattimien läpi (Jang ym. 2013). Näin todettiin saatavan 100-kertaisesti parempi vesikkelisaanto kuin eksosomien tuotolla soluviljelmästä. Luontaisten solukalvoproteiiniensa ansiosta nämä vesikkelit kohdistuivat paikkoihin,

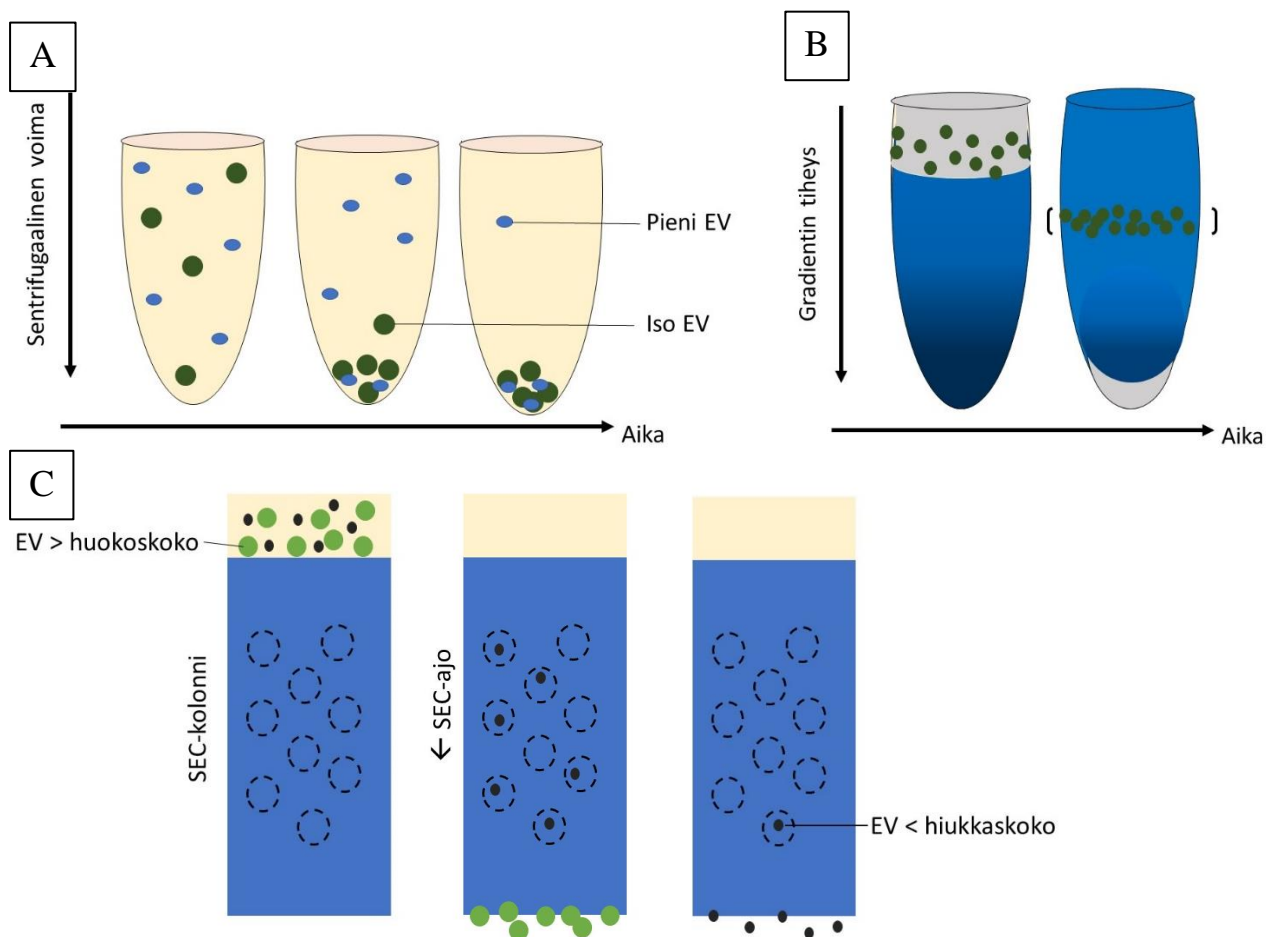
joissa endoteeli jakautuu nopeasti, kuten kasvaimiin. Doksorubisiinilla ladattuna näiden vesikkelien osoitettiin toimivan tehokkaammin kuin vapaa lääke, eivätkä vesikkelit aiheuttaneet sivuvaikutuksia. Myös verihiutaleista tuotetuilla mikropartikkeleilla saatiin eräässä tutkimuksessa aikaan suuri partikkelisaanto sekä samanaikainen lääkkeen pakkautuminen partikkeleihin (Kailashiya ym. 2019). Näiden verihiutale-mikropartikkelien avulla doksorubisiini saatiin kohdennettua paremmin leukemiasoluihin kuin pelkällä vapaalla lääkeaineella, jolloin muuhun kuin kohdekudokseen kohdistuvat (haitta)vaikutukset saatiin minimoitua.

2.2 Menetelmät solunulkoisten vesikkelien tutkimuksessa

EV:itä tutkittaessa on tärkeää osoittaa, että tutkimuksessa käytetyt partikkelit todellakin ovat EV:itä. Alan kansainvälinen järjestö, International society of extracellular vesicles on linjannut, että EV:t täytyy aina eristää solunulkoisesta nesteestä (Lötvall ym. 2014, Théry ym. 2018). Tästä syystä EV:iden tuotantoon käytettyjä soluja käsiteltäessä tulee välttää niiden solukalvon rikkomista, sillä se heikentäisi kerättävien EV:iden puhtautta. EV:t tulisi karakterisoida vähintään kahdella eri menetelmällä kulloisenkin EV-näytteen ominaispiirteiden selvittämiseksi. Esimerkiksi näytteiden kokojakauma voidaan varmistaa vertaamalla läpäisyelektronimikroskooppi-kuvia (transmission electron microscope, TEM) nanopartikkeleiden jäljitysanalyysistä saatuihin tuloksiin (nanoparticle tracking analysis, NTA). Myös yleiskuva EV:iden proteiiniokoostumuksesta on hyvä selvittää esimerkiksi western blot -analyysin avulla.

2.2.1 Solunulkoisten vesikkelien eristämiseen käytetyt menetelmät

EV:itä voidaan eristää biologisista nesteistä tai solukasvatusliuoksesta esimerkiksi kokonsa, muotonsa, tiheydensä tai varauksensa avulla (Coumans ym. 2017). Yleisimmin käytetyt EV:iden eristysmenetelmät ovat differentiaalisentrifugaatio, tiheysgradienttisentrifugaatio ja geelifiltraatio (kuva 2). Näiden lisäksi EV:itä on mahdollista eristää myös ultrafiltraatiolla, immunosaostuksella sekä sakkauttamalla. Yleisimmät menetelmät esitellään tässä tarkemmin.



Kuva 2. Yleisimmät EV:iden eristysmenetelmät. A. Differentiaalisentrifugaatiossa EV:t painuvat sentrifugaalisen voiman työntämänä koeputken pohjaan: ensin suurikokoiset EV:t ja sentrifugointiajan pidentyessä pienikokoiset. B. Tiheysgradienttisentrifugaatiossa erottelu määräytyy partikkelien tiheyden mukaan, ja EV:t kulkevat gradientilla ominaistiheydensä mukaiseen kohtaan. C. Geelifiltraatiossa EV:t kulkevat huokoisen SEC-matriisin läpi. Huokosia suuremmat EV:t eluoituvat ensin ulos SEC-pylvästä, kun taas pienemmät EV:t kulkeutuvat matriisissa pidempään. Kuva mukailtu Coumans ym. 2017 mukaisesti.

Yleisin EV:iden eristämiseen käytetty menetelmä on differentiaalisentrifugointi (Böing ym. 2014). Differentiaalisentrifugoinnissa EV-liuokseen kohdistuu asteittain kasvava sentrifugaalinen voima, jolloin EV:t sedimentoituvat kokonsa ja tiheydensä määrittämällä voimalla (Cvijetkovic ym. 2014; Coumans ym. 2017). Aluksi liuosta sentrifugoidaan pienellä nopeudella, jotta solut ja solujätteet saadaan pelletöityä ja poistettua liuoksesta (Théry ym. 2006; Coumans ym. 2017). Tämän jälkeen supernatantin ultrasentrifugoinnilla saadaan ensin eristettyä suuret EV:t (10 000-20 000 g), ja sitten pienet EV:t (100 000-200 000 g). Differentiaalisentrifugaatio saattaa kuitenkin eristää EV:iden mukana myös proteiiniaggregaatteja.

Tiheysgradientin avulla EV:t erottuvat kokonsa ja tiheydensä mukaan (Coumans ym. 2017). Gradientti tehdään useimmiten sakkaroosista tai jodiksanolista. Sentrifugoinnin aikana EV:t kulkevat gradientin läpi ja asettuvat omaa tiheyttään vastaavaan kohtaan gradientilla. Tiheysgradientilla näytteestä saadaan poistettua muun muassa mahdolliset proteiinipartikkelit, joilla on erilainen tiheys kuin EV:illä (Webber ja Clayton 2013). Jodiksanoli pystyy eristämään EV:itä tehokkaammin kuin sakkaroosi: Cantin ym. (2008) totesivat tutkimuksessaan, että jodiksanolitiheysgradientilla pystyttiin erottamaan jopa eksosomit ja HIV-1 -virus toisistaan, vaikka niiden koko ja tiheys ovat samanlaiset.

Viime aikoina yhä enemmän kiinnostusta herättänyt EV-eristystekniikka on geelifiltraatio. Geelifiltraatio eli SEC (size exclusion chromatography) erottelee näytteen molekyyliekoon mukaan fraktioiksi niin, että suuret EV:t eluotuvat kromatografiapylvästä ulos ennen pienempiä proteiineja ja partikkeleita (Böing ym. 2014). Tarkempi kokoerotelu riippuu geelimateriaalin huokoskoosta (Coumans 2017; Monguió-Tortajada ym. 2019): huokoskokoa pienemmät partikkelit ajautuvat väliaikaisesti SEC-materiaalin huokosiin, jolloin niiden eluutioaika hidastuu, ja ne kulkeutuvat materiaalissa pidempään. Huokoskokoa isommat partikkelit taas eivät jää SEC-matriisiin, vaan eluotuvat ulos pylvästä ennen pieniä partikkeleita. SEC on tehokas menetelmä EV:iden puhdistukseen, ja se säilyttää EV:iden biologisen aktiivisuuden (Böing ym. 2014).

Veren lipoproteiinit, erityisesti HDL ja LDL, ovat yleisiä kontaminantteja, kun EV:itä yritetään erottaa plasmasta (Yuana ym. 2014; Sòdar ym. 2016; Karimi ym. 2018).

Plasman HDL:n on huomattu eristyvän EV:iden mukana ultrasentrifugaatiossa EV:itä muistuttavan tiheydensä vuoksi (Feingold ja Grunfeld 2000; Yuana ym. 2014). LDL:n taas on todettu eristyvän EV:iden mukana useilla eri eristysteknikoilla (Sòdar ym. 2016). Tämän epäillään johtuvan siitä, että LDL muistuttaa kooltaan EV:itä. Lisäksi LDL saattaa aggregoitua EV:n pintaan. Usean eri puhdistusmenetelmän yhdistelmällä voi kuitenkin olla mahdollista saada EV:t ja lipoproteiinit erotettua paremmin toisistaan (Karimi ym. 2018).

2.2.2 Solunulkoisten vesikkeliä karakterisointiin käytetyt menetelmät

Virtaussyöttömetrialla on mahdollista havaita partikkelien aiheuttama valonsironta ja mitata fluoresenssivärjätyjen partikkelien fluoresenssi (Dragovic ym. 2011; Szatanek ym. 2017). Näin

saadaan tietoon EV:iden koon ja määrän lisäksi EV:iden fenotyyppi. Vaikka virtaussytometria on nopea ja tehokas menetelmä EV:iden karakterisoinnissa, sen käyttöä rajoittaa erityisesti se, että sillä voidaan toistaiseksi luotettavasti tunnistaa vain yli 200 nm kokoisia partikkeleita riippuen niiden taitekertoimesta. EV:iden tapauksessa sitä voidaan siis käyttää vain suurten partikkelien karakterisoinnissa.

Nanopartikkeleiden jäljitysanalyysillä eli NTA:lla voidaan määrittää EV:iden kokojakauma ja konsentraatio näytteessä (Dragovic ym. 2011; Szatanek ym. 2017). NTA:ssa näyte altistetaan lasersäteelle ja partikkeleita tarkastellaan niistä siroavan valon ja lämpöliikkeen avulla. NTA-mittaus on nopeaa, eikä vaadi monimutkaista näytteen valmistelua. Se soveltuu myös heterogeenisen partikkeliliuoksen analysointiin, ja se pystyy määrittämään kappaleiden kokoluokan välillä 50-1000 nm. On kuitenkin tärkeää muistaa, ettei NTA pysty erottelemaan EV:itä muista samankokoisista partikkelista ilman fluoresenssivärijäystä.

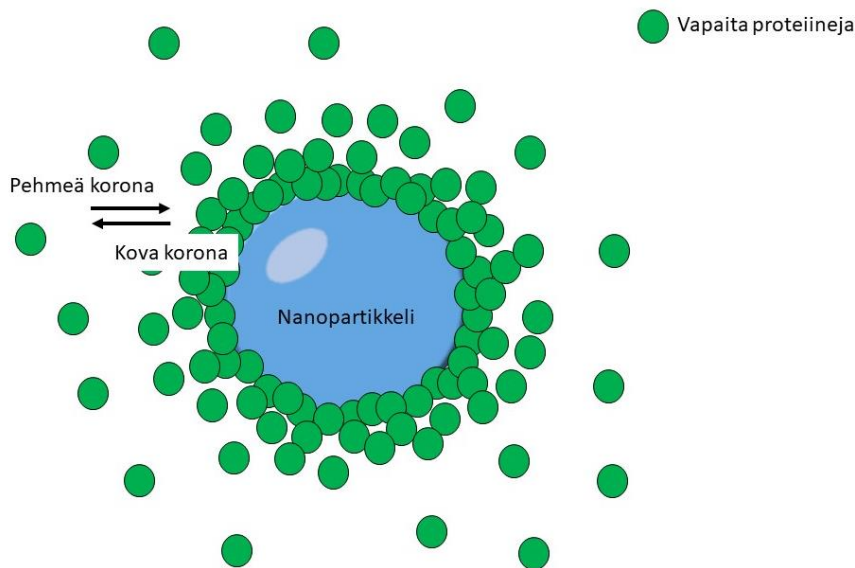
Elektronimikroskopia on yleisesti käytetty tekniikka biologisten näytteiden visualisointiin ja karakterisointiin (Szatanek ym. 2017). Lämpöelektronimikroskopoinnissa eli TEM:ssä, kuva syntyy elektroni-interferenssin seurauksena, kun elektronit läpäisevät näytteen. TEM:llä saadaan kuvia jopa 1 nm resoluutiolla, ja kuvien avulla voidaan arvioida näytteessä olevien EV:iden läpimitta, sekä konsentraatio suurpiirteisesti. TEM-kuvat ovat yleinen tapa varmistaa esimerkiksi NTA:lla määritetyn kokojakauman paikkansapitävyys. Ennen TEM-kuvausta näyte täytyy kiinnittää kuvausristikkoon ja kuivata. Käsittely on suhteellisen nopeaa, mutta vaatii harjaantumista, oikeanlaista käsittelytapaa sekä sopivaa näytekonsentraatiota. Lisäksi kuivaus ja TEM-mikroskopointi tyhjiössä saattavat vaikuttaa biologisten näytteiden olemukseen.

EV:iden koon ja kokojakauman lisäksi on suositeltavaa selvittää myös yleiskuva EV-näytteiden proteiinikoostumuksesta (Lötvall ym. 2014, Théry ym. 2018). EV-näytteistä löytyy usein tietty joukko yleisiä vesikkeliproteiineja sekä solutyypille ominaisia proteiineja (Choi ym. 2013, Théry ym. 2018). Nämä proteiinit ovat pääasiassa lähtöisin joko solukalvosta, sytosolista tai endosomista. Vesikkelinäytteistä löydetään usein muun muassa solun tukirangan proteiineja kuten aktiinia ja tubuliinia, lämpöshokkiproteiineja, tetraspaniineja (CD9, CD63 ja CD81) sekä vesikkelin liikkumiseen liittyviä proteiineja (TSG101 ja Alix). Näitä proteiinimarkkereita voidaan tunnistaa Western blot -analyysillä. EV-näytteiden proteiinikoostumusta määritettäessä tulee selvittää usean eri proteiinin esiintyminen näytteessä: EV-näytteistä tulisi selvittää vähintään kolme positiivista ja yksi negatiivinen proteiinimarkkeri. Tarkoituksena on osoittaa, että

EV-näytteeseen rikastuu sille tyypillisiä proteiineja, ja ettei näytteestä löydy esimerkiksi muiden soluorganellien proteiineja.

3 PROTEIINIKORONA

Kun nanopartikkelit injektoidaan elimistöön, ne altistuvat kehon nesteille kuten verelle ja solunesteelle. Näissä nesteissä olevat biomolekyylit ympäröivät nanopartikkelit, ja muodostavat niin kutsutun proteiinikoronan niiden ympärille (Nierenberg ym. 2018). Proteiinikorona jaotellaan pehmeään ja kovaan koronaan (kuva 3): pehmeä korona muodostuu proteiineista, jotka sitoutuvat vain heikosti nanopartikkeliin, kun taas kovassa koronassa proteiinit sitoutuvat tiukemmin nanopartikkeliin.



Kuva 3. Proteiinikoronan muodostuminen nanopartikkelin ympärille. Proteiinit, joilla on suuri affiniteetti nanopartikkeliin, sitoutuvat tiiviisti kiinni partikkelin pintaan muodostaen kovan proteiinikoronan (Nierenberg ym. 2018). Pehmeä proteiinikorona muodostuu partikkeliin heikosti sitoutuneista proteiineista. Pehmeän ja kovan proteiinikoronan välillä tapahtuu jatkuvasti proteiinienvaihtoa.

Tutkimuksissa on osoitettu, että nanopartikkelien fysiokemialliset ominaisuudet (koko, muoto ja varaus) vaikuttavat proteiinikoronan koostumukseen (Nierenberg ym. 2018). Proteiinikoronan muodostuminen on kuitenkin dynaaminen prosessi, jota ei vielä ymmärretä kovin hyvin. Proteiinikoronalla voi olla sekä positiivisia että negatiivisia vaikutuksia nanopartikkelien kiertoon kehossa. Proteiinikorona voi estää partikkelien aggregaatiota ja edistää niiden soluunottoa,

mutta se saattaa myös estää haluttua toimintaa tai aiheuttaa immunologisen puolustusjärjestelmän aktivaation. Joka tapauksessa proteiinikoronan muodostumisella on merkittävä vaikutus nanopartikkelin biologiseen toimintaan, ja se vaikuttaa suuresti partikkelien biologiseen hyötyosuuteen, tehokkuuteen sekä puhdistumaan.

Julkaistua tutkimustietoa EV:iden proteiinikoronasta ei löytynyt tutkimuksen alussa, joten taustatutkimukseen ja esimerkkeihin on käytetty liposomien ja muiden nanopartikkelien proteiinikoronasta tehtyjä tutkimuksia.

3.1 Perinteisesti käytetyt proteiinikoronan analysointimenetelmät

Yleisin proteiinikoronan eristämiseen käytetty tekniikka on sentrifugointi (Pederzoli ym. 2017; Weber ym. 2018). Se on nopea ja helppo tekniikka, joka todennäköisimmin kuitenkin eristää vain kovan proteiinikoronan. Uudempi ja jatkuvasti suosiota kasvattanut menetelmä on SEC. SEC:llä on mahdollista erottaa nanopartikkeli-proteiinikorona -kompleksi liuoksen vapaista proteiineista niiden toisistaan poikkeavan koon avulla. Erottelumenetelmänä SEC on hellävaraisempi kuin sentrifugaatio, joten sillä saatettaisiin pystyä eristämään myös osa heikommin sitoutuneista koronaproteiineista eli pehmeä korona.

Proteiinikoronan kehittymistä voidaan seurata dynaamisen valonsironnan avulla (dynamic light scattering, DLS). DLS:n avulla voidaan määrittää liuoksessa olevan partikkelin hydrodynaaminen halkaisija (Pederzoli ym. 2017; Szatanek ym. 2017; Weber ym. 2018). Kun nanopartikkelin halkaisija muuttuu biologisessa nesteessä inkuboinnin jälkeen, se on merkki nanopartikkelin ympärille syntyneestä proteiinikoronasta. Dynaamista valonsirontaa voidaan käyttää suoraan nanopartikkelien ja biologisen nesteen seokseen tai vasta nanopartikkeli-proteiinikorona -kompleksin eristämisen jälkeen. DLS tulokset ovat kuitenkin luotettavia vain, jos mitattavat nanopartikkelit ovat keskenään samankokoisia. Proteiinikoronan paksuutta voidaan tutkia DLS:n lisäksi muun muassa elektronimikroskopiolla.

Vapaiden proteiinien poistamisen jälkeen nanopartikkeli-proteiinikorona-kompleksin proteiini-koostumusta tutkitaan useimmiten SDS-PAGE geelielektroforeesilla ja massaspektrometri-

alla (Lundqvist ym. 2011; Weber ym. 2018). Näyteliuoksen proteiinit erotellaan toisistaan geielektroforeesin avulla, jonka jälkeen proteiinit tunnistetaan massaspektrometrinen analyysin avulla. Kun nanopartikkeli-proteiinikorona -kompleksista löytyviä proteiineja ja niiden määriä verrataan asianmukaisesti tehtyjen kontrollinäytteiden tuloksiin, saadaan selville mitkä proteiinit kertyvät proteiinikoronaan. Proteiinikoronan proteiinikoostumuksen lisäksi koronaproteiinin interaktiota on mahdollista tutkia muun muassa titrauskalorimetriallla, pintaplasmoniresonanssilla, Z-potentiaalimittauksilla sekä erilaisilla tietokonesimulaatioilla (Pederzoli ym. 2017; Weber ym. 2018).

Proteiinikoronan vaikutusta nanopartikkelien biologiseen toimintaan tutkitaan solukokeilla, jotta voidaan esimerkiksi arvioida lisääkö vai vähentääkö proteiinikorona partikkelien soluunottoa (Weber ym. 2018; Leibe ym. 2019; Palchetti ym. 2019). Värjättyjä tai leimattujen nanopartikkeleiden soluunottoa voidaan tarkastella myös kudosleikkeillä (Palchetti ym. 2019; Zhang ym. 2019)

3.2 Proteiinikoronan vaikutus nanopartikkelien biologiseen tehokkuuteen

Proteiinikoronalla on huomattava merkitys nanopartikkelilääkkeen tehokkuuteen, sillä proteiinikorona vaikuttaa suuresti partikkelin soluunottoon sekä siihen, kuinka nanopartikkeli pääsee vaikuttamaan kehossa. Liposomaalinen doksorubisiini on ollut jo pitkään käytössä Yhdysvalloissa syöpälääkkeenä, mutta kliinisellä tasolla sen teho on kuitenkin jäänyt pieneksi (O'Brian ym. 2004; Caracciolo ym. 2018). Lääkkeen odotettua heikompi kliininen teho selittyy ainakin osittain *in vivo* -olosuhteissa tapahtuvilla nano-biointeraktioilla, jotka muuttavat nanopartikkelin pintaominaisuuksia ja näin myös partikkelin toimintaa. Caracciolo ym. (2018) huomasivat, että proteiinikoronan muodostuminen vaikutti doksorubisiini-liposomien stabiilisuuteen. Proteiinikorona näytti häiritsevän liposomien pintaa niin, että doksorubisiini vuoti ulos liposomista, mikä taas heikensi valmisteen syöpäsoluja tappavaa tehoa. Tämä osoittaa sen, kuinka tärkeää nanopartikkelin pintaan muodostuvan biomolekyylikoronan sekä sen vaikutuksien tutkiminen on.

Monissa tutkimuksissa nanosilikapartikkelien on huomattu olevan haitallista keuhkoihin inhaloitaessa (Murugadoss ym. 2017). Esimerkiksi Leibe ym. (2019) osoittivat, että heidän kokeessaan nanosilikapartikkelien pintaan muodostuva proteiinikorona esti tulehdusreaktiota ja toksisuutta solutasolla. Tutkimuksessa seerumin proteiinien muodostama proteiinikorona nanosilikan pinnalla vähensi partikkelien sytotoksisuutta sekä makrofageissa että keuhkojen epiteelisoluisissa. Tämän lisäksi proteiinikoronan todettiin vähentävän tulehdusreaktiota välittävän IL-8:n erittymistä. Tutkimuksessa todettiin myös, että proteiinikorona nanosilikan pinnalla paransi partikkelien soluunottoa.

3.3 Pehmeä proteiinikorona

Useimmiten tutkimuksissa käytetään ultrasentrifugointia proteiinikoronan eristämiseen, jolloin jäljelle jää vain kova proteiinikorona. Weberin tutkimusryhmä (2018) julkaisi vastikään keinon pehmeän proteiinikoronan eristämiseksi asymmetrisellä poikittaisvirtauskenttävirtausfraktioidinnalla (asymmetric flow field-flow fractionation, AF4). Ryhmä vertasi polystyreenin nanopartikkelien pintaan muodostuvan proteiinikoronan eristämistä vapaista plasmaproteiineista AF4:lla ja perinteisellä sentrifugaatiolla. AF4:lla onnistuttiin eristämään aggregaatti, joka ei ollut vapaata proteiinia eikä puhdas nanopartikkeli, joten ryhmä päätteli sen olevan proteiinikoronan ympäröimä nanopartikkeli. Vaikka sentrifugaatio osoittautui tehokkaaksi keinoksi vapaiden plasmaproteiinien poistamiseen, sen todettiin olevan niin raju menetelmä, että se poistaa myös osan proteiinikoronasta: *in situ* DLS-mittaukset paljastivat AF4-näytteiden halkaisijan olevan suurempia kuin sentrifugaationäytteiden, mikä viittasi suurempikokoisen proteiinikoronan eli pehmeän koronan läsnäoloon. Tämän lisäksi sentrifugoitujen ja AF4-käsiteltyjen nanopartikkelien proteiinikoronan proteiinikoostumus oli erilainen: sentrifugoidun näytteen proteiinikoronassa oli muun muassa enemmän lipoproteiineja. AF4-käsitellyissä näytteissä taas oli paljon seerumin albumiinia ja immunoglobuliineja.

3.4 Proteiinikoronan tulevaisuuden käyttömahdollisuudet

Lundqvist ym. (2011) tutkivat, miten kovan proteiinikoronan koostumus muuttuu, kun ensin plasmassa inkuboidut nanopartikkelit siirretään sytosoliin. Saatua tulosta verrattiin sitten pelkässä plasmassa tai sytosolissa inkuboitujen partikkelien tuloksiin. Ryhmä totesi odotetusti, että nanopartikkelien proteiinikoronan koostumus muuttuu, kun ne viedään yhdestä biologisesta nesteestä toiseen, mikä on osoitus proteiinikoronan dynaamisesta luonteesta: ympäristön vaihdoksen yhteydessä jotkin plasmaproteiinit irtoavat nanopartikkelista ja niiden tilalle sitoutuu sytosoliproteiineja, joilla on suurempi affiniteetti nanopartikkelin pintaan. Tutkimusryhmä huomasi, että kovan koronan proteiinikoostumus näiden kahden biologisen nesteen jälkeen muuttui enemmän plasman kuin sytosolin tuottamaa proteiinikoostumusta, mutta silti siinä oli löydettävissä elementtejä molemmista. Tulos viittaa siihen, että partikkelin proteiinikorona sisältää jäljen sen aiemmasta ympäristöstä. Tämä on tärkeä tieto, kun halutaan tutkia ja kohdentaa nanopartikkelien *in vitro* ja *in vivo* kulkeutumista.

Palchetti ym. (2019) tutki erilaisten liposomien pinnalle kertyvää proteiinikoronaa tarkoituksenaan ennustaa syntetisoitujen liposomien kohdennustehokkuus. Tutkimusryhmä selvitti ensin kirjallisuuden perusteella mitkä proteiinikoronassa olevat niin sanotut sormenjälkiproteiinit vaikuttivat positiivisesti liposomien soluunottoon. Tämän jälkeen ryhmä katsoi, kuinka paljon näitä sormenjälkiproteiineja löytyi tutkimuksessa syntetisoitujen liposomien pinnalle muodostuneesta proteiinikoronasta. Seuraavaksi ryhmä testasi, kuinka hyvin liposomi-proteiinikorona-komplekseja otettiin sisään kohdesoluihin, ja odotetusti kompleksit, joissa oli eniten sormenjälkiproteiineja, olivat tehokkaimpia. Tutkimus osoittaa erityisesti sen, että proteiinikoronaa olisi mahdollista käyttää myös nanopartikkelien kohdentamiseen. Tietoa proteiinikoronasta voidaan siis käyttää tehokkaammin toimivien nanopartikkeleiden kehittämiseen.

Juuri julkaistussa artikkelissaan Zhang ym. (2019) kertoivat onnistuneensa kohdentamaan liposomi-lääkepartikkelin aivoihin manipuloimalla liposomin ympärille muodostuvaa proteiinikoronaa. Liposomit valmistettiin niin, että ne houkuttelivat pinnalleen tiettyjä koronaproteiineja: tavoitteena oli, että proteiinikoronaan saadaan liitettyä aivoihin kohdentavia apolipoproteiineja. Tutkimuksessa todettiin, että nämä liposomit kohdentuvat onnistuneesti aivoihin, ja että ne pysyvät kuljettamaan mukanaan syöpälääke doksorubisiinia aivoihin. Tämän tuloksen perusteella terapeuttisten nanopartikkelien kohdentaminen tiettyyn paikkaan proteiinikoronan avulla on

siis mahdollista. Erityisesti lääkkeiden kohdentaminen aivoihin herättää suurta kiinnostusta, sillä aivojen veri-aivoeste estää monien systeemisesti annosteltujen lääkkeiden pääsyn aivoihin.

Lähtöoletus on, että nanopartikkelin siirtyessä biologisesta nesteestä toiseen suuri osa pehmeän koronan proteiineista vaihtuu, sillä niillä on pienempi affiniteetti nanopartikkeliin kuin kovalla proteiinikoronalla (Pederzoli ym. 2017). Tällä hetkellä on kuitenkin vaikea määrittää tarkkaa rajaa pehmeän ja kovan koronan välillä. Lisäksi tiedetään, että proteiinikoronan koostumus riippuu paitsi käytetystä nanomateriaalista, myös monista muista parametreista, kuten biologisen nesteen koostumuksesta. Proteiinikoronan muodostuessa koronaproteiinit eivät muodosta vuorovaikutuksia pelkästään nanopartikkelin vaan myös muiden koronaproteiinien kanssa. Tämän monimutkaisen vuorovaikutuksen selvittämiseksi tarvitaan yhdenmukaista tutkimusta ja yhteinen linjaus siihen, kuinka proteiinikoronaa ja sen vaikutuksia voidaan tutkia. Kun proteiinikoronasta on tarpeeksi tutkimustietoa, voidaan Palchettin ja Zhangin tutkimusryhmän (2019) tapaan alkaa tutkimaan mahdollisuutta hyödyntää proteiinikoronaa lääkenanopartikkelin kohdennusvälineenä.

4 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

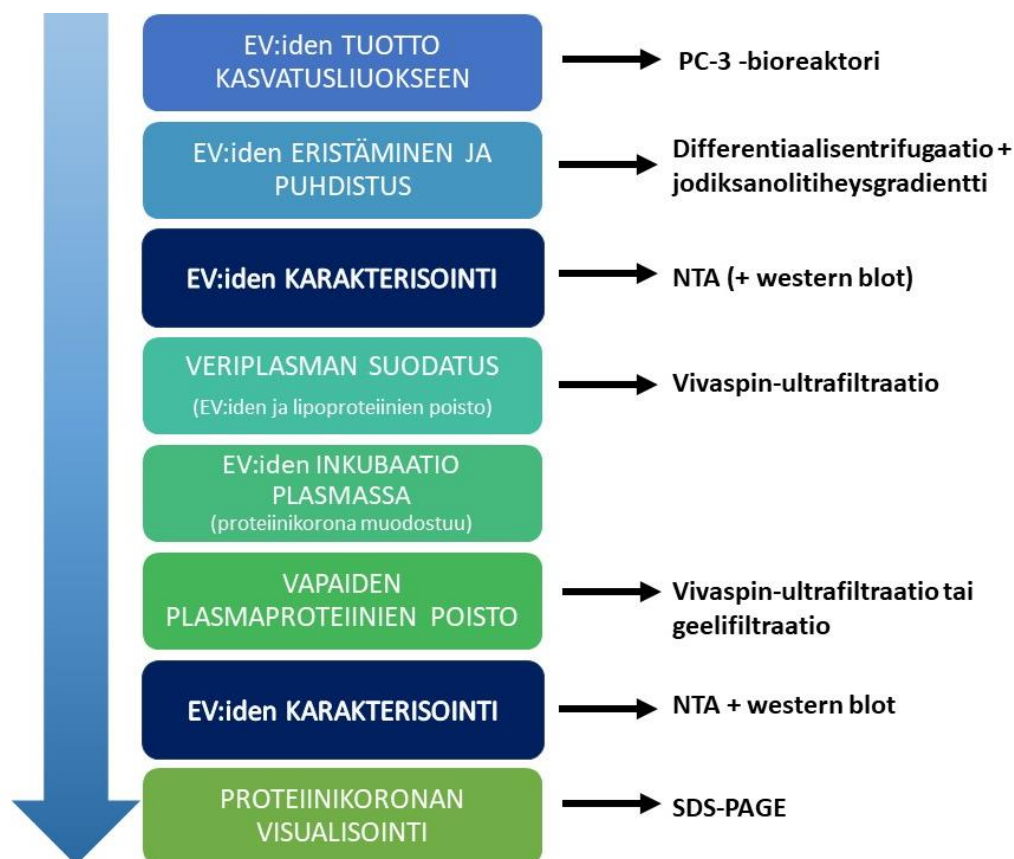
Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia EV:iden pinnalle veriplasman vaikutuksesta muodostuvaa proteiinikoronaa sekä kehittää proteiinikoronan eristämiseen sopivia menetelmiä. Tutkimuksessa käytettiin PC-3-solulinjan tuottamia EV:itä.

Tutkimuksen alussa tiedonhaulla ei pystytty löytämään viiteartikkeleita, joissa olisi käsitelty EV:iden pinnalle muodostuvaa proteiinikoronaa. Tutkimusryhmässä EV:iden proteiinikoronan tutkimista oli aloitettu jo aiemmin, joten tehty työ pohjattiin aiemmin saatuihin tuloksiin.

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

5.1 Tutkimuksen pääpiirteet

Tutkimuksen pääpainona oli selvittää, miten EV:iden plasma-inkubaation jälkeen liuoksessa olevat vapaat plasmaproteiinit saataisiin mahdollisimman hyvin erilleen muodostuneesta EV-proteiinikorona -kompleksista. Vapaiden plasmaproteiinien poistoon kokeiltiin ultrafiltraatiota ja SEC:iä. Molemmat tutkimussuunnat noudattivat samoja välivaiheita (kuva 4). Kaikki kokeet toistettiin kolmeen kertaan.



Kuva 4. EV:iden pinnalle muodostuvan proteiinikoronan tutkimisen välivaiheet ja niissä käytetyt menetelmät. EV:itä tuotettiin bioreaktorissa PC-3 -eturauhassyöpäsoluilla. Tämän jälkeen EV:t kerättiin differentiaalisentrifugaatiolla ja puhdistettiin jodiksanolitiheys-gradientilla. EV- ja lipoproteiinivapaata plasmaa valmistettiin Vivaspin-ultrafiltraatiolla. EV:iden plasmainkubaation jälkeen vapaat plasmaproteiinit täytyi poistaa liuksesta, jotta EV:iden pinnalle muodostunutta proteiinikoronaa voitiin tutkia. Tätä testattiin Vivaspin-ultrafiltraatiolla ja geelifiltraatiolla. EV:t karakterisoitiin nanopartikkelien jäljitysanalyysillä (NTA) sekä western blot -analyysillä. Lopuksi EV:iden pinnalle muodostunutta proteiinikoronaa tarkasteltiin SDS-PAGE:lla.

Proteiinikoronakokeissa käytettiin plasmassa inkuboidun EV -näytteen (EV-P) lisäksi vastaavalla tavalla käsiteltyä EV-kontrollia (EV-0) ja plasmakontrollia (P-0) (taulukko 1). Geelijaajoissa geelille pyrittiin lisäksi laittamaan verrokiksi aina myös EV-kantaliuosta ja suodatettua plasmaa, jotta voitiin nähdä, miten käsittely on vaikuttanut näytteiden proteiinikoostumukseen.

Taulukko 1. Proteiinikoronakokeissa käytetyt näytteet, niiden lyhenteet ja sisältö. EV-P näytteeseen verrattuna EV-0 -näytteessä plasma on korvattu vastaavalla määrällä PBS-liuosta, ja P-0 -näytteessä taas EV:t on korvattu vastaavalla määrällä PBS-liuosta. EV-0 toimii kokeissa EV-kontrollina ja P-0 plasmakontrollina.

Näyte	Lyhenne	Näytteen sisältö
Plasmainkuboidut EV:t	EV-P	EV + plasma
EV-kontrolli	EV-0	EV + PBS
Plasmakontrolli	P-0	PBS + plasma

Proteiinikoronan muodostumista eri nanopartikkelien pintaan sekä proteiinikoronan erottamista vapaista plasmaproteiineista testattiin Vivaspin-ultrafiltraatiolla myös kahdella eri nanopartikkelistandardilla: 100 nm -kokoisilla Nanosphere 3100A (Thermo Fisher Scientific, Fremont, Kalifornia, USA) sekä 200 nm -kokoisilla Silica-partikkeleilla (Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Saksa). Nämä näytteet valmistettiin samaan tapaan kuin EV-P -näyte, mutta EV:t korvattiin vastaavalla määrällä nanopartikkelistandardia.

5.2 Solunulkoisten vesikkelien tuottaminen

Tutkimuksessa käytettiin PC-3 -eturauhassyöpäsolulinjaa tuottamaan EV:itä. PC-3 on eturauhassyöpäsolulinja, jota käytetään tutkittaessa pitkälle edennyttä eturauhassyöpää (Kaighn ym. 1979). PC-3 -solut hankittiin American Type Culture Collectionilta, ja ne siirrettiin CELLline AD 1000 -bioreaktoriin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). CELLline AD 1000 -bioreaktorissa on kaksi kammiota, jotka on erotettu toisistaan 10 kDa huokoskoon selluloosamembraanilla: toisessa kammiossa kasvatettiin PC-3 -solut (n. 15 ml) ja toisessa kammiossa oli ravinneliuos (n. 0.75 l). Bioreaktorissa solujen puolella käytettiin Advanced DMEM/F-12 -liuosta, johon lisättiin 4.5 g/l glukoosia (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) ja 2 mM L-glutamiinia (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Ulkokammiossa käytettiin Ham's F-12K (Kaighn's, Gibco, Carlsbad, Kalifornia, USA) -liuosta, johon lisättiin 10 % naudan sikiön seerumia (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Carlsbad, Kalifornia, USA) ja 4.5 g/l glukoosia.

Solukasvatusta säilytettiin Heracell 150 -inkubaattorissa (Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Saksa) +37 °C:ssa ja 5 %:n CO₂-konsentraatiossa.

5.3 Solunulkoisten vesikkelien eristäminen ja puhdistus

PC-3 -EV:t (n. 15 ml) kerättiin bioreaktorista muutaman päivän välein ja eristettiin differentiaalisentrifugaatiolla. Aluksi kerätty soluliuos sentrifugoitiin Eppendorf 5804 R -sentrifugilla (Eppendorf AG, Hampuri, Saksa) 2500 g:llä 25 minuuttia +4 °C:ssa, jolloin mahdolliset solupartikkelit pelletöityivät. Supernatantti kerättiin talteen ja ultrasentrifugoitiin Optima L-80XP ultrasentrifugilla (Ordiar Beckman Coulter, Brea, Kalifornia, USA) käyttäen SW 32 Ti -roottoria ensin 20000 g:llä +4 °C:ssa yhden tunnin ajan, ja tästä erottunut supernatantti vielä 110000 g:llä +4 °C:ssa kaksi tuntia. Ultrasentrifugaatioista syntyneet EV-pelletit yhdistettiin ja liuotettiin 500 µl:aan PBS-puskuriliuosta (laimennettu 10xPBS-liuoksesta: 1.37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄) (pH = 7.2).

Differentiaalisentrifugaation jälkeen EV:t puhdistettiin vielä mahdollisista proteiinijäämistä epäjatkuvalle jodiksanolitiheysgradientilla. Tiheysgradientin valmistukseen käytettiin Optiprep-jodiksanoliliuosta (Optiprep Density Gradient Medium, Sigma-Aldrich, Oslo, Norja). Jodiksanoligradientti muodostettiin lisäämällä EV-näytteeseen jodiksanolia 45 %:n (w/v) lopputitoisuuteen ja sen päälle lisättiin 35 %:n ja 0 %:n jodiksanoliluokset. Gradienttia sentrifugoitiin Optima L-80XP -ultrasentrifuugilla käyttäen SW 41 Ti -roottoria 200000 g:llä + 4 °C:ssa kolme tuntia tai yön yli ilman jarrua. Tiheysgradientissa erottunut EV-kerros otettiin varovasti talteen, ja jodiksanoli huuhdottiin pois näytteistä pesemällä niitä viisi kertaa 15 ml:llä PBS:ää Amicon Ultra -15 10 kDa -sentrifugifiltterien (Merck Millipore, Dublin, Irlanti) avulla Eppendorf 5804 R -sentrifugilla 5000 g:llä +4 °C:ssa. Lopuksi EV-liuos konsentroitiin noin 500 µl:n tilavuuteen, jaettiin eppendorf-putkiin, jotka säilöttiin -80°C -pakastimessa.

5.4 Näytteissä olevien partikkelien määrän ja kokojakauman karakterisointi

Näytteissä olevien partikkelien määrä ja kokojakauma analysoitiin NTA:lla käyttäen NanoSight-laitetta (LM14C, sininen laser, 405 nm, 60 mW, Nanosight, Salisbury, UK), johon

oli yhdistetty sCMOS-kamera (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japani). Videodata tallennettiin NTA 3.1 -ohjelmalla (taulukko 2). Näytteitä laimennettiin tarpeen mukaan PBS:llä (1:1, 1:100, 1:500 tai 1:1000), ja PBS-liuoksen partikkelimäärä mitattiin sellaisenaan taustan selvittämiseksi. Laimennoksissa pyrittiin pääsemään pitoisuuteen, jossa NTA:lla havaittaisiin 50-100 partikkelia/ruutu.

Taulukko 2. NTA -mittauksissa ja tulosten analysoinneissa käytetyt asetukset NTA 3.1 -ohjelmassa.

NTA-mittaus	
Ohjelma	SOP Standard measurement
Kamerataso	16
Kameran suljinaika	1300
Puskurin viskositeetti	vesi
Mittausaika (s)	90
Rinnakkaisia mittauksia	3
Tulosten analysointi	
Partikkelien detektoraja	5
Sumeus	automaattinen
Partikkelien odotettu koko	automaattinen

5.5 Veriplasma ja sen suodatus

Veriplasma ostettiin SPR:n Veripalvelulta tuorepakastettuna plasmana, joka on pakastettu 24 tunnin sisällä verenluovutuksesta. Plasma jaettiin pienempiin osiin ja säilytettiin pakastettuna -80 °C:ssa. Ennen käyttöä tarvittava määrä plasmaa sulatettiin +37 °C vesihauteessa sekoituksessa mahdollisimman nopeasti. Sulatuksen jälkeen plasmaa säilytettiin huoneenlämmössä. Ennen kokeita plasmasta poistettiin EV:t, lipoproteiinit ja muut suuret partikkelit Vivaspin 20 (Sartorius stedim, Stonehouse, UK) 1000 kDa -sentrifugifiltterin avulla. Erickson (2009) on määrittänyt yhtälön, jolla voidaan muuntaa pyöreiden proteiinien molekyylipaino Daltonaista nanometreiksi:

$$R_{\min} = (3V/4\pi)^{1/3} = 0,066M^{1/3},$$

jossa M on kappaleen koko Daltona ja R_{\min} kappaleen säde nanometreinä. Yhtälön mukaan 1000 kDa molekyylipaino vastaa pallomaista proteiinia, jonka läpimitta on 12.1 nm. Koska EV:t ovat läpimitaltaan yli 30 nm kokoisia (van der Pol ym. 2012; Szatanek ym. 2017), niiden ei pitäisi päästä 1000 kDa suodattimen läpi vaan jäädä suodattimeen. Vivaspin-suodatuksen tuloksena pitäisi siis syntyä plasmaa, josta on poistettu EV:t ja muut niitä suuremmat partikkelit.

Ennen Vivaspin-suodatusta juuri sulatettu plasma suodatettiin Sertolab 0.22 μm PES -vakuumisuodattimen (Sartorius stedim, Stonehouse, UK) läpi liuoksen tasaisuuden varmistamiseksi. Plasma (n. 20 ml) suodatettiin Vivaspin-suodattimien läpi Heraeus/Baxter Megafuge 1.0 -sentrifugilla (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) swingin bucket -roottorilla 3000 g:llä huoneenlämmössä, kunnes suurin osa plasmasta saatiin suodatettua. Vivaspin-suodatuksen jälkeen plasma steriilisuodatettiin vielä 0.22 μm Millex-GV PVDF-ruiskusuodattimilla (Merck Millipore, Dublin, Irlanti) steriileissä olosuhteissa. Vivaspin-suodatetun ja suodattamattoman plasman proteiiniprofiilin vastaavuus tarkistettiin lopuksi SDS-PAGE:lla ja SEC:llä.

5.6 Solunulkoisten vesikkelien proteiinikoronan eristäminen

5.6.1 Vivaspin-ultrafiltraatio

Aluksi testattiin, jäisivätkö EV:t kiinni Vivaspin-suodattimien suurimolekyylikokoisiin 1000 kDa -huokosiin: 10 μl :aa EV-kantaliuosta (3.1×10^{10} partikkelia) laimennettiin 10 ml:aan PBS:ää ja suodatettiin lähes tyhjäksi Vivaspin-suodattimilla Eppendorf 5804 R -sentrifugilla 3000 g:llä +4 °C:ssa. Suodattimeen jäänyt osuus (n. 100 μl) kerättiin talteen NTA-analyysyä varten, suodattimeen lisättiin PBS:ää ja pesu toistettiin kaksi kertaa.

Seuraavaksi EV:iden plasmainkubaation jälkeen vapaiden plasmaproteiinien poistoa testattiin Vivaspin-suodatuksella. 200 μl :aa EV-kantaliuosta ($2.4\text{--}5.4 \times 10^{11}$ partikkelia) sekoitettiin 5 ml:aan suodatettua plasmaa, ja liuosta inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia. EV- ja plasmakontrollit valmistettiin samaan tapaan. Tämän jälkeen Vivaspin-suodattimet täytettiin 20 ml:aan asti PBS:llä ja suodatettiin tyhjäksi Swinging bucket -roottorilla Megafuge 1.0 -sentrifugilla 3000 g:llä huoneenlämmössä. Pesu toistettiin neljä kertaa, minkä jälkeen EV:t irrotettiin sentrifugifiltteristä 500 μl :lla 2 % SDS-liuosta. Vivaspin-proteiinikorona -näytteet analysoitiin SDS-PAGE -geelillä sellaisenaan ilman erillistä konsentroitivälivaihetta.

5.6.2 Geelifiltraatio

Plasmainkubaation jälkeen EV-proteiinikorona -kompleksin erottamista vapaista plasmaproteiineista testattiin myös SEC:llä. SEC suoritettiin Bio-Radin NGC Chromatography System -laitteella ja 40 ml:n Econo-pylväällä (1 cm x 50 cm), joka täytettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti Sephacryl S-300 -hiekillä (GE Healthcare, Uppsala, Ruotsi). Valmistajan tietojen mukaan Sephacryl S-300 pystyy erottamaan 10-1500 kDa:n kokoisia pallomaisia molekyylejä (materiaalin huokoskoko 13 nm), jolloin EV:t ja muut suuret partikkelit eluoituvat ensimmäisenä ulos pylväältä. Plasmanäytteet laimennettiin aina vähintään 50 %:a viskositeetin vähentämiseksi: 200 µl:aa EV-kantaliuosta ($2.6-4.6 \times 10^{11}$ partikkelia) ja suodatettua plasmaa sekoitettiin suhteessa 1:1, ja liuoksen annettiin inkuboitua huoneenlämmössä 10 minuuttia. EV- ja plasmakontrollit valmistettiin samaan tapaan. Näytteet laimennettiin 500 µl:n näytetilavuuteen PBS:llä ja näyte injektoidiin SEC-laitteeseen 500 µl:n näytesilmukan kautta. SEC-ajojen tarkemmat kromatografiavaiheet määritettiin ChromLab-ohjelmalla (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) valmistajan suositusten mukaisesti (taulukko 3).

Taulukko 3. SEC-ajoihin käytetyn kromatografiaohjelman asetukset automaattisella NGC Chromatography System -laitteella. SEC-ajo koostui kolmesta vaiheesta: tasapainotus, näytteen lisäys ja eluutio. Ajoissa käytettiin tasaista virtausnopeutta, ja kutakin vaihetta jatkettiin taulukossa ilmaistun tilavuuden verran.

Ohjelman vaihe	Virtaus (ml/min)	V (ml)
Tasapainotus	0.39	5
Näytteen lisäys	0.39	2
Eluutio	0.39	60

SEC-ajoista kerättiin automaattisella fraktionkerääjällä 1 ml:n fraktioita eluutiovälillä 5-20 ml:aa. NGC Chromatography System tallensi automaattisesti näytteiden absorbanssin aallonpituuksilla 215, 255, 280 ja 495 nm. Näytteiden proteiinimäärän tarkkailuun käytettiin aallonpituutta 215 nm sen herkkyyden vuoksi sekä häiritsevien tekijöiden vähentämiseksi (Noble ja Bailey 2009). SEC-ajojen tulokset tallennettiin ChromLab-ohjelmalla, josta ne siirrettiin Microsoft Exceliin kuvaajien piirtoa varten.

SEC-ajon jälkeen EV-fraktion kohdalta kerättiin kahdet 1 ml:n näytteet, jotka yhdistettiin ja konsentroitiin noin 100 µl:n tilavuuteen Amicon Ultra -4 UltraCel 10 kDa -sentrifugisuodattimilla (Merck Millipore, Dublin, Irlanti). Tämän jälkeen selvitettiin näytteiden proteiinipitoisuus, ja näytteet analysoitiin SDS-PAGE:lla sekä western blot -analyysillä.

5.7 Näytteiden proteiinipitoisuuden määrittäminen

Ennen geelijaonoa proteiinien määrä näytteissä määritettiin kolorimetrisesti (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific, USA) bikinkoniinihappo-määrittäjätestillä. Proteiini-standardit (toimintaväli 0.2 - 2 µg/µl) valmistettiin testin ohjeiden mukaisesti naudan sikiön seerumista (BSA, bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). 96-kuoppalevyille pipetoitiin testin ohjeiden mukaisesti kahdet tai kolmet rinnakkaisnäytteet standardeista ja testinäytteistä, jonka jälkeen niihin lisättiin valmistajan ohjeiden mukaan valmistettua reagenssiliuosta. EV- ja proteiinikoronanäytteet määritettiin sellaisinaan ilman laimentamista. Plasmanäytteitä täytyi laimentaa, jotta niiden proteiinipitoisuus saatiin testin toimintavälille: suodattamaton plasma laimennettiin PBS:llä suhteessa 1:100, ja Vivaspin-suodatettu plasma laimennettiin suhteessa 1:20 tai 1:15. Näytekuoppiin oli valmiiksi pipetoitu SDS-liuosta niin, että sen pitoisuus kuopassa on 2 %, jotta EV:t saataisiin hajotettua ja proteiinit vapautettua liuokseen. 96-kuoppalevyä inkuboitiin 30 minuuttia +37 °C:ssa ilman sekoitusta, jonka jälkeen näytteiden absorptio 562 nm:ssä mitattiin Varioskan Lux -spektrofotometrillä (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) SkanIt 5.0 -ohjelmalla. Lopuksi näytteiden proteiinimäärät määritettiin proteiini-standardista piirretyn standardisuoran avulla.

5.8 Näytteiden proteiiniprofiilin analyysi: SDS-PAGE

SDS-PAGE suoritettiin 4-20 % Mini-PROTEAN TGX Stain-free -geeleillä (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA). Geelit asetettiin Mini-PROTEAN system -ajokammioon, ja ajopuskurina käytettiin 1x ajopuskuria (25 mM Tris, 192 mM glysiini, 0.1 % SDS). Riippuen näytteiden proteiinipitoisuudesta geelille otettiin 2.5 µg:aa, 5 µg:aa tai 10 µg:aa proteiinia kaivoa kohti: yhdelle geelille laitettiin aina yhtenäiset määrät proteiinia, ja käyttöön valittiin suurin mahdollinen proteiinimäärä. Näytteisiin lisättiin näytepuskuria (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2

% SDS, 25 % (v/v) glyseroli, 0.01 % bromofenolisininen, 5 % β -merkaptotoetanol) ja niitä inkuboitiiin lämpöblokissa +95 °C:ssa 5 minuuttia. Proteiinien kokomarkkerina käytettiin Page-Ruler Plus Prestained Protein Ladderiä (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), jossa oli yhdeksän eri proteiinia välillä 10-250 kDa. Näytteet pipetoitiin geelille, ja elektroforeesia ajettiin tasaisella virralla: 20 mA:a yhdelle geelille ja 40 mA:a kahdelle geelille, kunnes ajorintama oli ajautunut lähes geelin alareunaan.

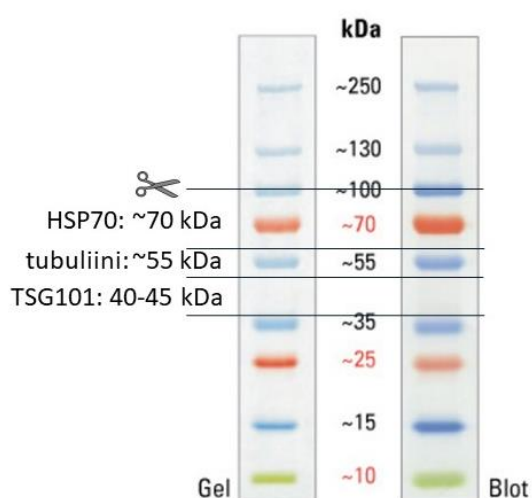
Elektroforeesin jälkeen geelit värjättiin joko Coomassie-sinisellä tai hopeavärjäyksellä. Coomassie-värjäys suoritettiin Bio-Safe Coomassie G-250 -värillä (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) valmistajan ohjeiden mukaisesti: geeli pestiin milliQ vedellä 15 minuuttia kolme kertaa. Tämän jälkeen geeliä värjättiin Coomassie G-250 värillä tunnin ajan, minkä jälkeen geeliä huuhdottiin milliQ vedellä vielä 30 minuuttia. Hopeavärjäys suoritettiin Pierce Silver Stain Kit -tarvikkeilla (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) valmistajan ohjeiden mukaisesti: Geeli pestiin milliQ vedellä 5 minuutin ajan kaksi kertaa, 30 %:n etanolin ja 10 %:n etikkahapon seoksella 15 minuuttia kaksi kertaa, 10 %:lla etanolilla 5 minuuttia kaksi kertaa ja milliQ vedellä 5 minuuttia kaksi kertaa. Tämän jälkeen valmistettiin Sensitizer Working Solution, jossa geeliä inkuboitiiin 1 minuutti, ja pestiin milliQ vedellä 1 minuutti kaksi kertaa. Seuraavaksi valmistettiin Stain Working Solution, jossa geeliä inkuboitiiin 30 minuuttia. Geeli pestiin nopeasti kaksi kertaa milliQ vedellä ja siirrettiin Developer Working Solutioniin. Kun proteiinijuovat olivat kehittyneet tarpeeksi (noin minuutin ajan) kehittäminen pysäytettiin 5 % etikkahapolla. Tämän jälkeen geeliä inkuboitiiin vielä 10 minuuttia etikkahapossa.

Kaikki geelit kuvannettiin ChemiDoc MP kuvannuslaitteella (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) ja Image Lab 6.0 -ohjelmalla käytetyn värjäystekniikan mukaisin asetuksin.

5.9 Vesikkelinäytteiden karakterisointi western blot -analyysillä

SDS-PAGE:n jälkeen geeleistä analysoitiin EV-markkerina käytetyt proteiinit, HSP70, tubuliini ja TSG101, western blotilla. Western blot geeleissä käytettiin PC-3 soluista valmistettua solulysaattia positiivisena kontrollina. Western blot suoritettiin käyttäen Trans-Blot Turbo Transfer Packia (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) 0.2 μ m:n nitroselluloosamembraanilla. SDS-PAGE geelin proteiinijuovat siirrettiin nitroselluloosamembraanille Trans-Blot® Turbo™

Transfer System -laitteen automaattisilla ohjelmilla. Membraania huuhdottiin TBS:llä, jonka jälkeen membraani siirrettiin seokseen, jossa oli 3 %:a BSA:ta TBS-T:ssä (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween 20). Tämä liuos toimi blokkiliuoksena, joka estää koettimien epäspesifisen sitoutumisen kalvolla. Membraania huuhdottiin TBS-T:llä 5-10 minuuttia kaksi kertaa. Membraani leikattiin vasta-aineiden teoreettisten sitoutumiskohtien mukaisiksi suikaleiksi (kuva 5), jotka laitettiin sitten primaaristen vasta-aineidensa kanssa inkuboitumaan 2 tunniksi tai yön yli heilutukseen +4 °C:ssa. EV-markkerien vasta-aineina käytettiin HSP70 (70 kDa, Purified Mouse Anti-Hsp 70, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA), α -tubuliinia (55 kDa, Monoclonal Mouse Anti- α -tubulin antibody, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) ja TSG101:sta (40-45 kDa, Purified Mouse Anti-TSG101, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Primäärivasta-aineet valmistettiin 3 %:n BSA TBS-T -liuokseen, johon lisättiin 0.02 %:a NaN_3 säilöntäaineeksi. HSP70-vasta-aine laimennettiin suhteessa 1:1000, tubuliini 1:1500 ja TSG101 suhteessa 1:750. Primaarivasta-aine -inkubaation jälkeen membraanisuikeleita pestiin erikseen TBS-T:llä 5 minuuttia 4-5 kertaa. Tämän jälkeen kaikki suikaleet inkuboitiin sekundäärisessä vasta-aineessa (GT-anti-Ms IgG1 Secondary Antibody HRP conjugate, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) tunnin ajan. Sekundäärinen vasta-aine valmistettiin laimentamalla sitä TBS-T:llä 1:4000. Lopuksi sitoutumaton vasta-aine pestiin pois huuhtelemalla suikaleita TBS-T:llä 5-10 minuuttia 4 kertaa, ja lopuksi vielä kerran pelkällä TBS:llä.



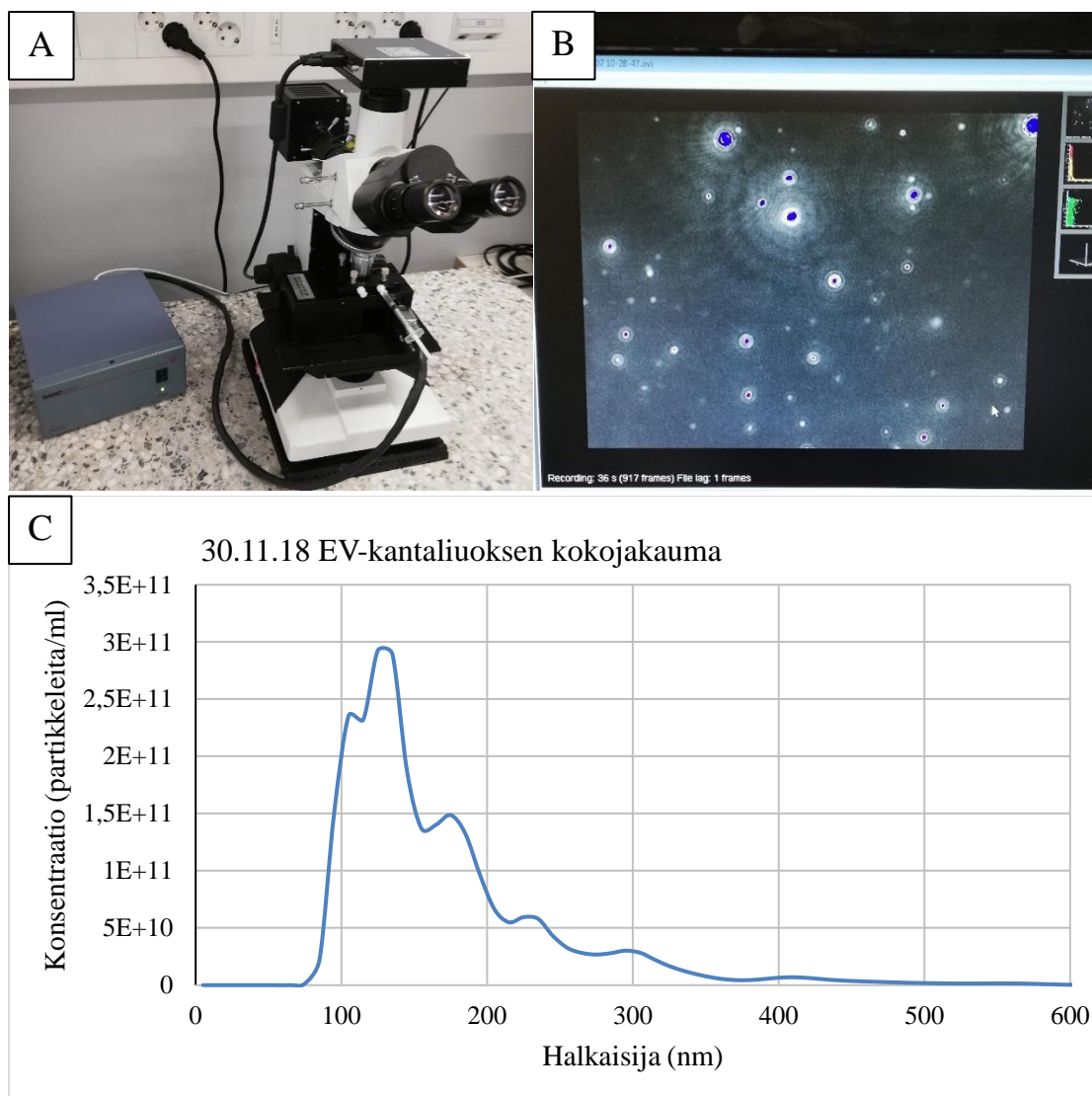
Kuva 5. Spesifisten vasta-aineiden (HSP70, tubuliini ja TSG101) teoreettisten kokojen mukaiset sitoutumiskohdat western blot -kalvolla. Western blot -kalvo leikattiin kuvassa indikoitujen leikkauskohtien mukaisesti suikaleiksi, jotka sitten inkuboitiin omissa vasta-aine -liuoksissaan western blot -analyysin aikana.

HRP sekundäärivasta-aineen konjugaatti (Clarity Western ECL substrate, Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) valmistettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti sekoittamalla reagensseja suhteessa 1:1. Blot-liuskat kasteltiin nopeasti vastavalmistetussa konjugaatissa, aseteltiin läpinäkyvän kalvon väliin ja kuvannettiin ChemiDoc MP kuvannuslaitteella ja Image Lab 6.0 -ohjelmalla käyttäen Chemiluminescence -asetuksia.

6 TULOKSET

6.1 Käytettyjen EV-kantaliuosten karakterisointi

Jotta saataisiin varmistettua, että tutkimuksessa käytetyt partikkelit ovat EV:itä, kokeissa käytetyt EV-kantaliuokset karakterisoitiin NTA:lla (kuva 6 ja taulukko 4), minkä lisäksi näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin kolorimetrisesti (taulukko 4). Kokojakaumakäyrän mukaan EV-kantaliuoksen partikkelit ovat EV:iden kokoluokkaa: suurin osa partikkeleista on välillä 90-200 nm. Myös muista kantaliuoksista määritetyt NTA-tulokset ovat saman suuntaisia. EV-näytteistä analysoitiin myöhemmin myös vesikkelimarkkerit western blot -analyysillä samanaikaisesti proteiinikoronanäytteiden kanssa (kuva 15).



Kuva 6. Nanopartikkeleiden jäljitysanalyysillä EV-näytteistä määritettiin partikkelien kokojakauma ja konsentraatio. A. NTA-laite. B. Kuvakaappaus vesikkelinäytteestä NTA 3.1 -ohjelmassa. C. 30.11.18 EV-kantaliuoksen kokojakaumakäyrä.

Taulukko 4. Tutkimuksessa käytettyjen EV-kantaliuosten ominaisuuksia. Partikkelipitoisuus ja halkaisija on määritetty NTA:lla. Proteiinipitoisuus on määritetty kolorimetrisesti bikinkonihappo-määrittelyksellä.

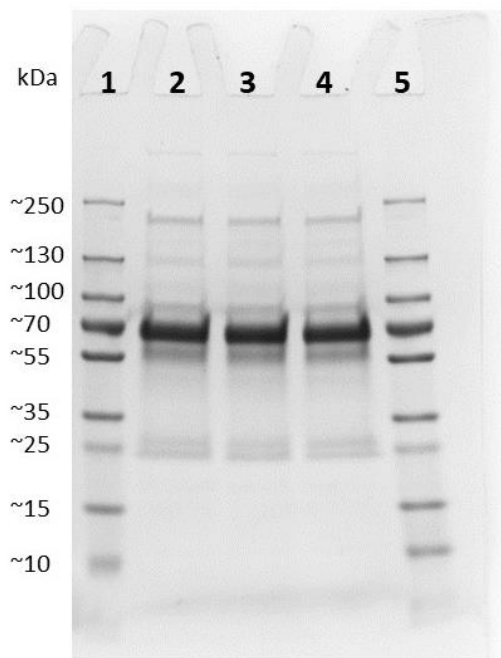
EV-kantaliuos	Partikkelipitoisuus (partikkelia/ml)	Halkaisija (nm)	Halkaisijan keskihajonta (nm)	Proteiinipitoisuus (mg/ml)
26.9.2018	1.78×10^{12}	179	77	0.45
30.11.2018	2.70×10^{12}	170	75	0.54
20.12.2018	2.10×10^{12}	163	74	0.51
5.2.2019	2.28×10^{12}	160	68	0.28

6.2 Vivaspin-suodatettu plasma

Kokeessa haluttiin varmistua siitä, että suodatettu plasma vastaa proteiinikoostumukseltaan suodattamatonta plasmaa, joten bikinkoniinihappo-määrityksellä selvitettiin suodattamattoman sekä suodatettujen plasmojen proteiinipitoisuus suodatuksen eri vaiheissa (taulukko 5). Tulosten mukaan proteiinin määrä näytteissä väheni huomattavasti Vivaspin-suodatuksen jälkeen. Vivaspin- ja Sertolab-suodatetun sekä suodattamattoman plasman proteiiniprofiilin vastaavuus tarkistettiin lisäksi SDS-PAGE:lla ja SEC:llä. SDS-PAGE-analyysin (kuva 7) mukaan näytteiden proteiiniprofiili oli samanlainen. Tätä tukivat myös SEC:llä saadut tulokset (kuva 8). Vivaspin-suodatetusta plasmasta analysoitiin myös partikkeliprofiili NTA:lla. Näiden tulosten (taulukko 7) mukaan suodatetusta plasmasta löytyvät partikkelit olivat alle 90 nm kokoisia. Plasmasta analysoitiin myöhemmin myös vesikkelimarkkerit western blot -analyysillä samanaikaisesti proteiinikoronanäytteiden kanssa (kuva 15).

Taulukko 5. Plasman proteiinipitoisuus suodatuksen eri vaiheissa. Tutkimuksessa käytetty plasma suodatettiin ensin Sertolab-suodattimella ja sen jälkeen Vivaspin-suodattimella. Näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin kolorimetrisesti bikinkoniinihappo-määrityksellä jokaisen suodatuksen jälkeen. Tuloksissa on otettu huomioon varsinaisessa proteiinipitoisuuden määrittäksessä käytetyt laimennokset.

Proteiinipitoisuus	Suodatus 1	Suodatus 2
Suodattamaton plasma	59.9 µg/µl	63.5 µg/µl
Sertolab-suodatettu plasma	58.8 µg/µl	73.1 µg/µl
Vivaspin-suodatettu plasma	12.3 µg/µl	10.2 µg/µl



Kaivo 1: Proteiinistandardi

Kaivo 2: Plasma (laimennos 1:100)

Kaivo 3: Sertolab-suodatettu plasma (laimennos 1:100)

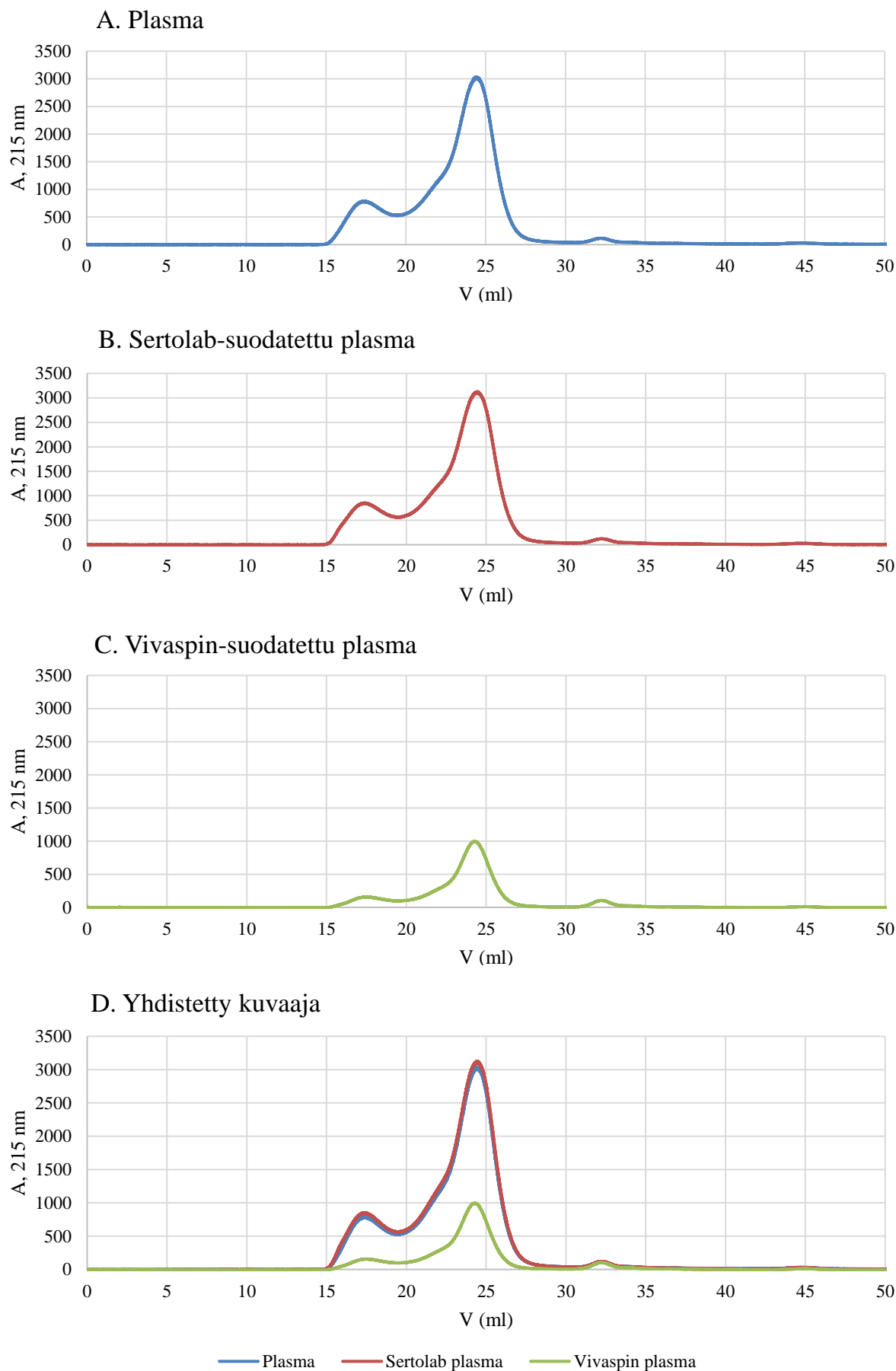
Kaivo 4: Vivaspin-suodatettu plasma (laimennos 1:20)

Kaivo 5: Proteiinistandardi

Kuva 7. SDS-PAGE geelikuva plasmasta, Sertolab-suodatetusta sekä Vivaspin-suodatetusta plasmasta. Näytteissä oli 10 µg proteiinia kaivoa kohden, ja geeli värjättiin Coomassilla ennen kuvaamista. Vasemmassa reunassa proteiinistandardien koot on ilmaistu kDa:na.

Taulukko 6. Vivaspin-suodatetun plasman partikkeliprofiili. Vivaspin-suodatetussa plasmassa olevat partikkelit analysoitiin NTA:lla.

	Partikkelipitoisuus (partikkelia/ml)	Halkaisija (nm)	Hajonta (nm)
Vivaspin-plasma 1	2.49×10^{11}	87	46
Vivaspin-plasma 2	3.58×10^{11}	81	36



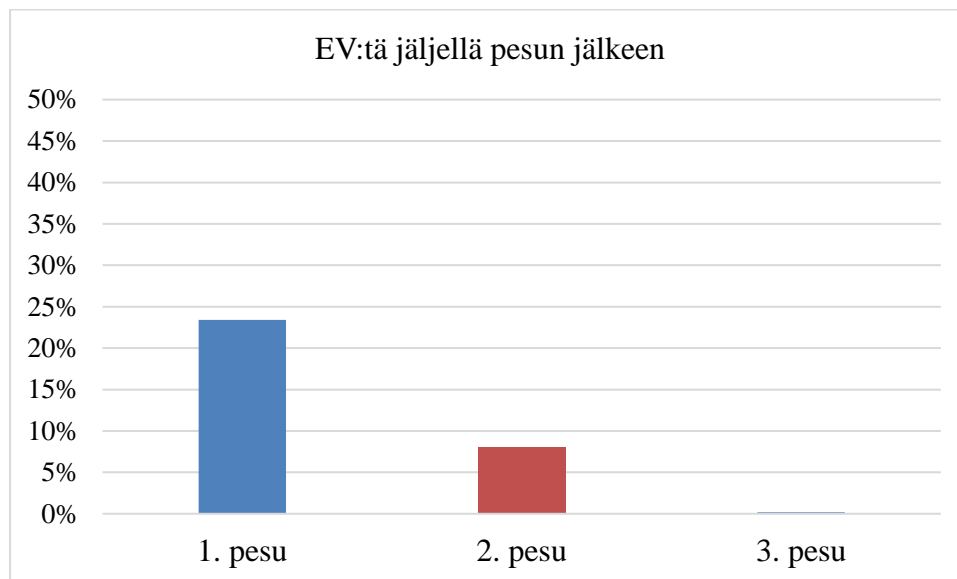
Kuva 8. SEC-kromatogrammit eri plasma-ajoista. A suodattamattoman plasman kuvaaja.

B Sertolab-suodatetun plasman kuvaaja. C Vivaspin-suodatetun plasman kuvaaja. D yhdistetty kuvaaja kaikista edellä mainituista. Proteiinien absorbanssi mitattiin aallonpituudella 215 nm:ä. Kuvaajat on katkaistu 50 ml:n eluutiotilavuudesta, sillä sen jälkeen ei enää eluoitunut piikkejä.

6.3 Proteiinikoronan eristäminen Vivaspin-ultrafiltraatiolla

6.3.1 Solunulkoisten vesikkeliön Vivaspin-suodatuksen testaaminen

EV:t saattavat jäädä kiinni suurikokoisiin filterisuodattimiin, joten testattiin, saataisiinko EV:t kerättyä pois Vivaspin-suodattimista PBS-pesujen jälkeen. Vain suhteellisen pieni osa Vivaspin-suodattimeen laitetuista EV:istä saatiin kerättyä talteen pesujen jälkeen (kuva 9). Suodattimen läpi tullessa suodoksessa ei havaittu partikkeleita.

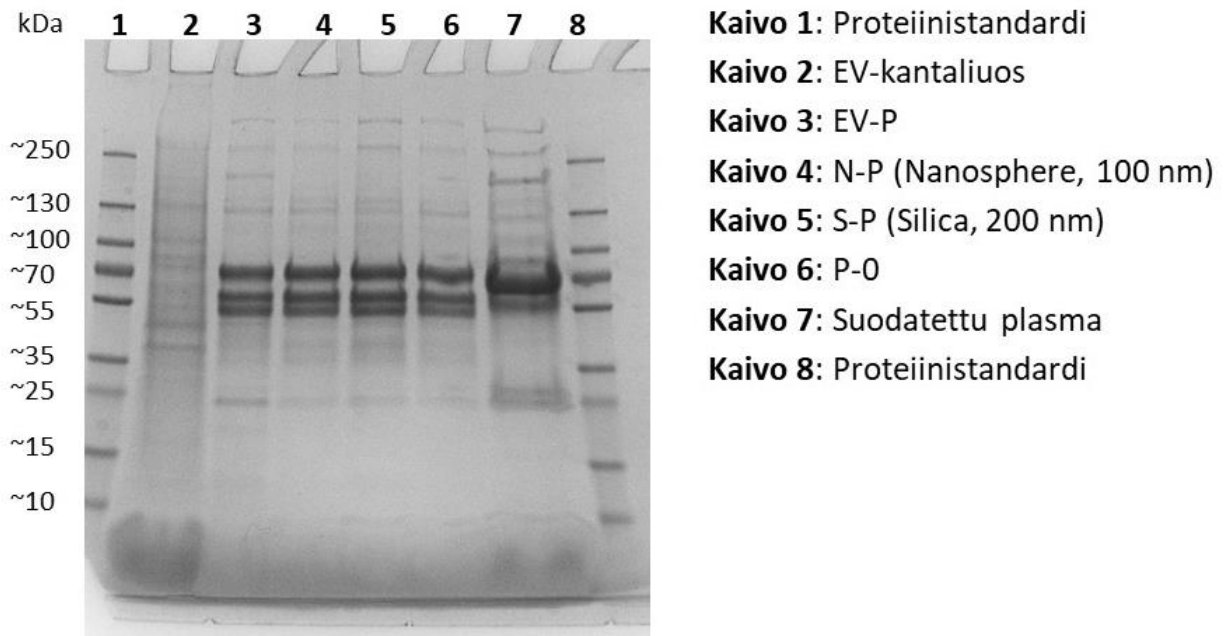


Kuva 9. Vivaspin-suodattimien testaus EV:illä: jäävätkö EV:t kiinni suodattimeen. Vivaspin-suodattimeen laitettiin EV-kantaliuosta, ja näytettä pestiin PBS:llä. Pylväät kuvaavat sitä kuinka suuri osa partikkeleista saatiin kerättyä pois suodattimesta kunkin peräkkäisen pesun jälkeen. Partikkelimäärät määritettiin NTA:lla.

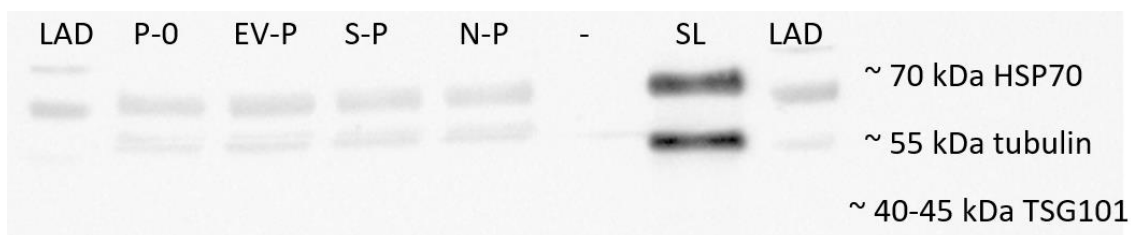
6.3.2 Proteiinikoronan eristäminen Vivaspin-ultrafiltraatiolla

Kokeessa testattiin, olisiko Vivaspin-suodattimen avulla mahdollista saada EV:t ja niiden proteiinikorona erotettua plasman vapaista proteiineista. Vivaspin-suodatuksen ja pesujen jälkeen proteiinikoronanäytteiden proteiiniprofiili selvitettiin SDS-PAGE:lla. EV-kontrollina toimivat

EV-0 -näytteet olivat proteiinimääriltään niin laimeita, että niitä ei saatu näkymään geelillä (kuva 10). EV:iden ja nanopartikkelistandardien proteiinivyyöhykkeet muistuttavat huomattavasti plasmakontrollinäytettä, eikä niiden välillä ole juurikaan nähtävissä eroa. SDS-PAGE -analyysin jälkeen vastaavien näytteiden proteiiniprofiilia tarkasteltiin myös western blot -analyysillä, joka näytti kaikille näytteille haalean positiivisen tuloksen (kuva 11).



Kuva 10. SDS-PAGE -geelikuva Vivaspin-käsitellyistä proteiinikoronanäytteistä ja niiden kantaliuoksista. Näytteissä oli 10 µg proteiinia kaivoa kohden, ja geeli värjättiin Coomassilla ennen kuvaamista. Kaivoissa 3-6 on Vivaspin-suodatetut proteiinikoronanäytteet. Verrokkina toimivat kaivon 2 EV-kantaliuos ja kaivon 7 plasma. Vasemmassa reunassa on ilmaistu proteiinistandardien koot. EV-P: plasmassa inkuboitu EV-näyte; S-P: plasmassa inkuboitu nanopartikkelistandardi (Silica); N-P: plasmassa inkuboitu nanopartikkelistandardi (Nanosphere); P-O: plasmakontrolli.

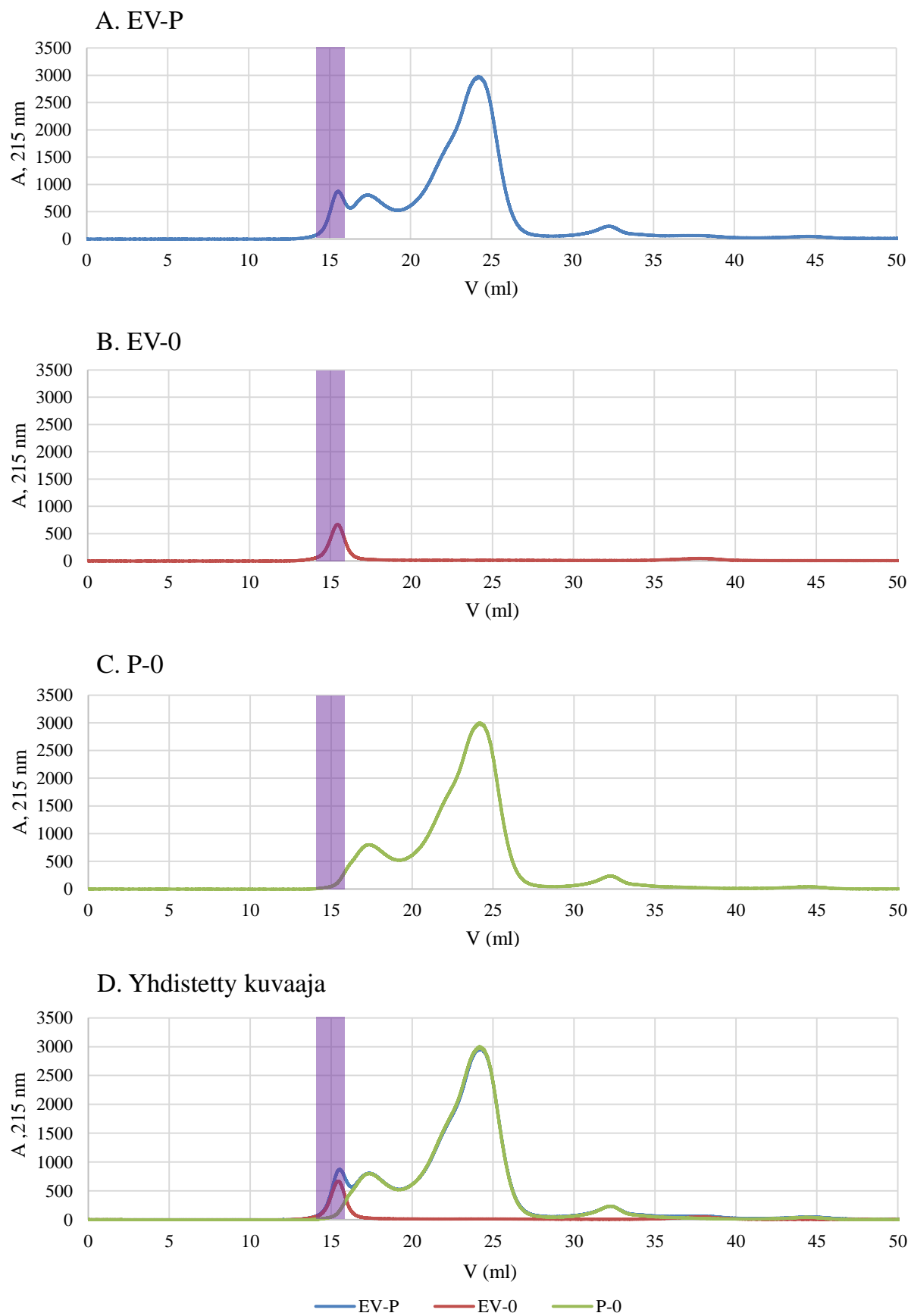


Kuva 11. Western blot -kalvokuva Vivaspin-käsitellyistä proteiinikoronanäytteistä. Oikeassa reunassa on ilmaistu western blot -analyysissä käytetyt vasta-aineet (HSP70, tubuliini ja TSG101) ja niiden määrittämyskohta geelillä. LAD: proteiinistandardi; P-O: plasmakontrolli; EV-P: plasmassa inkuboitu EV-näyte; S-P: plasmassa inkuboitu nanopartikkelistandardi (Silica); N-P: plasmassa inkuboitu nanopartikkelistandardi (Nanosphere); -: plasmakontrolli.

N-P: plasmassa inkuboitu nanopartikkelistandardi (Nanosphere); SL: PC-3-solulysaatti (positiivinen kontrolli).

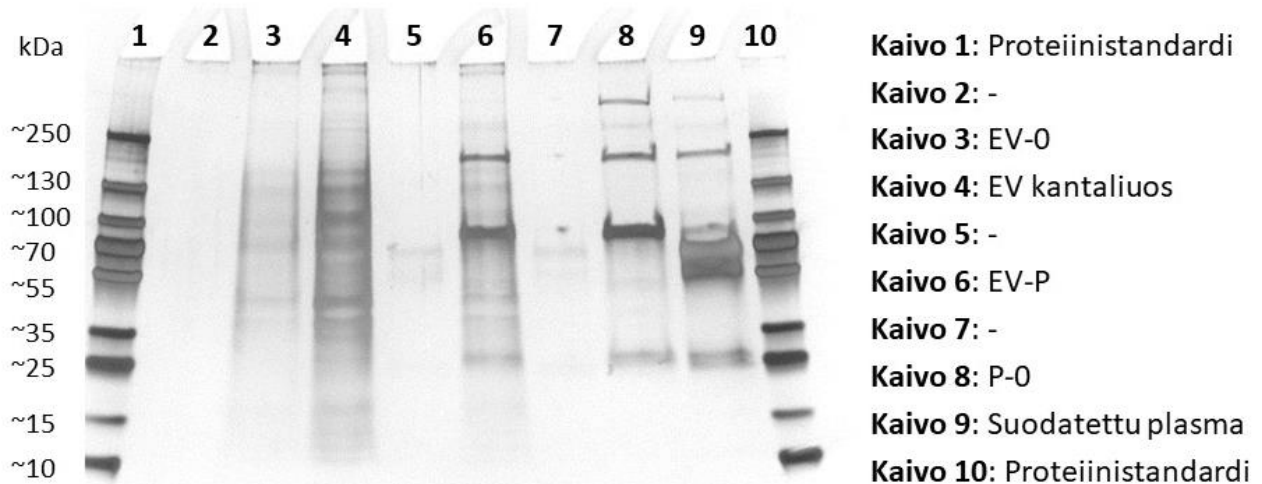
6.4 Proteiinikoronan eristäminen geelifiltraatiolla

EV:iden proteiinikoronan erottamista plasman vapaista proteiineista kokeiltiin myös geelifiltraation avulla. Proteiinikorona-näytteet ajettiin SEC-pylvään läpi ja automaattinen kromatografialaite tallensi näytteiden proteiinin absorbanssin SEC-ajon aikana. EV-piikki saatiin lähestulkoon eristettyä vapaista proteiineista, mutta EV- ja proteiinipiikki menevät kuitenkin hiukan päällekkäin (kuva 12). SEC-ajon jälkeen EV-piikin kohdalta kerättiin kahdet 1 ml:n näytteet kaikista kolmesta ajosta, näytteet konsentrointiin, ja niiden proteiinikoostumus selvitettiin SDS-PAGE:lla (kuvat 13 ja 14): EV-P, EV- ja plasmakontrolli eroavat kaikki toisistaan. Lisäksi niiden proteiinivyöhykkeistä on löydettävissä yhteneväisyyksiä suodatetun plasma- tai EV-kantaliuosnäytteen kanssa.

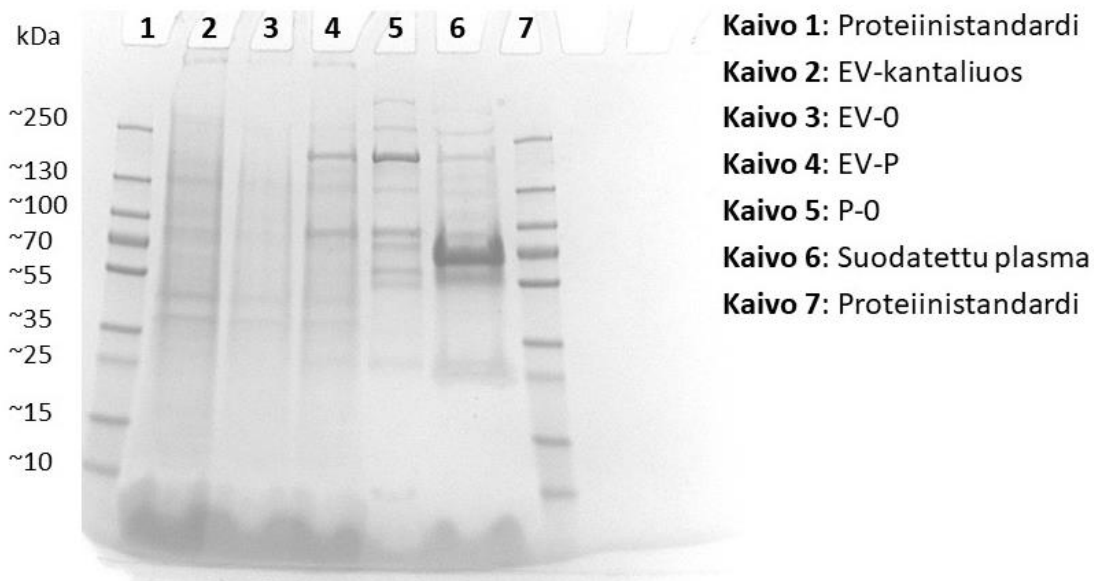


Kuva 12. SEC-kromatogrammi eri proteiinikoronanäytteistä. A EV-P -kuvaaja. B EV-0 -ku-

vaaja. C P-0 -kuvaaja. D yhdistetty kuvaaja kaikista edellä mainituista. Proteiinien absorbanssi mitattiin aallonpituudella 215 nm. Violetilla korostetuista kohdista kerättiin 2 ml:n näytteet jatkoanalyyysiä varten. Kuvaaja on katkaistu 50 ml eluutitilavuudesta, sillä sen jälkeen ei eluutunut piikkejä. EV-P: plasmassa inkuboitu EV-näyte; EV-0: EV-kontrolli; P-0: plasmakontrolli.

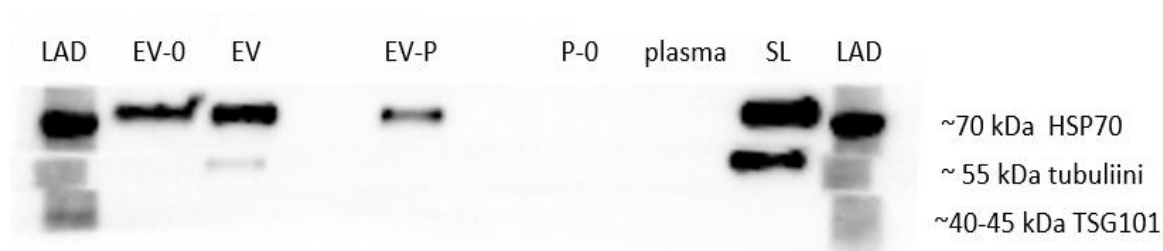


Kuva 13. Silver stain -värjätty SDS-PAGE-geeli SEC-proteiinikoronanäytteistä. Näytteissä on 2.5 µg proteiinia kaivoa kohden. Proteiinikoronanäyte ja sen kontrollinäytteet ovat kaivoissa 6, 3 ja 8. Kaivot 2, 5 ja 7 ovat tyhjiä. Vasemmassa reunassa on ilmaistu proteiinistandardien koot. EV-0: EV-kontrolli; EV-P: plasmassa inkuboitu EV-näyte; P-0: plasmakontrolli.



Kuva 14. Coomassie-värjätty SDS-PAGE-geelikuva SEC-proteiinikoronanäytteistä. Näytteissä on 5 µg proteiinia kaivoa kohden. Proteiinikoronanäyte ja sen kontrollinäytteet ovat kaivoissa 3-5. Vasemmassa reunassa on ilmaistu proteiinistandardien koot. EV-0: EV-kontrolli; EV-P: plasmassa inkuboitu EV-näyte; P-0: plasmakontrolli.

SEC:n avulla erotetut proteiinikoronanäytteet analysoitiin western blotilla: EV-näytteet antavat positiivisen signaalin kalvolla (kuva 15). SEC-kokeissa käytetyt EV-määrät, EV-saanto SEC-ajojen jälkeen, sekä muita tietoja näytteistä kerättiin lopuksi yhteen (taulukko 7).



Kuva 15. Western blot -kalvokuva SEC-proteiinikoronanäytteistä. Oikeassa reunassa on ilmaistu western blot -analyysissä käytetyt vasta-aineet (HSP70, tubuliini ja TSG101) ja niiden määrityskohta geelillä. LAD: proteiinistandardi; EV-0: EV-kontrolli; EV: EV kantaliuos; EV-P: plasmassa inkuboitu EV-näyte; P-0: plasmakontrolli; SL: PC-3 -solulysaatti (positiivinen kontrolli).

Taulukko 7. Proteiinikoronanäytteiden partikkelimäärät ennen SEC-ajoja, saannot ja proteiinin määrä. Näytteiden partikkelimäärät määritettiin NTA:lla. Proteiinipitoisuus on määritetty kolorimetrisesti Piercen BCA-testillä. Näytemäärä (partikkeleita) kertoo sen, kuinka paljon EV:itä on laitettu näytteisiin ennen SEC-ajoa. EV-P -saantotuloksissa on otettu huomioon P-0 antama partikkelitausta. EV-0 -saantotuloksissa on otettu huomioon EV-0_taudan antama partikkelitausta. EV-P: plasmassa inkuboitu EV-näyte; EV-0: EV-kontrolli; P-0: plasmakontrolli; EV-0_tauda: SEC-partikkelitausta absorbanssin ollessa tasainen.

	SEC-näyte	Näytemäärä (partikkeleita)	EV-saanto (partikkeleita)	EV-saanto%	Halkaisija (nm)	Proteiinipitoisuus (mg/ml)
SEC-ajo 1	EV-P	2.6×10^{11}	1.5×10^{11}	56 %	153	0.24
	P-0	0	6.6×10^9		130	0.32
	EV-0	2.6×10^{11}	1.1×10^{11}	42 %	173	0.13
	EV-0_tauda	0	1.1×10^7		190	-
SEC-ajo 2	EV-P	2.8×10^{11}	9.7×10^{10}	31 %	154	0.22
	P-0	0	1.1×10^{10}		134	0.1
	EV-0	2.8×10^{11}	6.3×10^{10}	22 %	154	0.07
	EV-0_tauda	0	4.8×10^8		182	-
SEC-ajo 3	EV-P	4.6×10^{11}	8.2×10^{10}	17 %	157	0.17
	P-0	0	4.0×10^9		214	0.07
	EV-0	4.6×10^{11}	1.3×10^{11}	28 %	150	0.09
	EV-0_tauda	0	5.4×10^8		156	-

7 TULOSTEN TARKASTELU

7.1 EV:iden karakterisointi

EV-kantaliuoksista määritettiin nanopartikkeleiden jäljitysanalyysillä niissä olevien partikkelien kokojakauma ja konsentraatio. Mittaustulosten (kuva 6 ja taulukko 4) mukaan näytteistä määritetyt partikkelit ovat EV:iden kokoisia, noin välillä 90-200 nm. Eri EV-eristysten aikana sekä EV:iden koko että saanto partikkelien koko pysyi samana. EV:iden tuotto oli siis hyvin toistettavaa. EV-kantaliuosnäytteestä oli löydettävissä western blotilla sekä HSP70 että tubuliini (kuva 15). Voidaan siis todeta, että kokeessa käytetyt partikkelit olivat EV:itä.

7.2 Vivaspin-suodatettu plasma vastaa proteiiniprofiililtaan suodattamatonta plasmaa

Kokeissa käytetty veriplasma suodatettiin Vivaspin-suodattimilla plasman omien EV:iden poistamiseksi. Aiemmin mainitun Ericksonin (2009) määrittämän yhtälön mukaan EV:iden ja muiden yli 13 nm:n kokoisten partikkelien ei pitäisi läpäistä Vivaspin-suodattimen 1000 kDa huokosia, joten EV:iden pitäisi jäädä suodattimeen ja suodoksen olla EV-vapaata plasmaa. Suodatus poistaa EV:iden lisäksi plasmasta muita suurikokoisia partikkeleita, kuten lipoproteiineja (Feingold ja Grunfeld 2000), joten suodatetun ja suodattamattoman plasman proteiiniprofiilin vastaavuus haluttiin tarkistaa. Mikäli Vivaspin-suodatus muuttaisi plasman proteiiniprofiilia merkittävästi, ei sen käyttö proteiinikoronakokeissa olisi tarkoituksenmukaista.

Suodattamattoman ja suodatetun plasman proteiinipitoisuus selvitettiin kolorimetrisesti bikiniinihapon määrittämisellä (taulukko 5), ja tuloksista on nähtävissä, että Sertolab-suodatus ei juurikaan muuttanut plasman proteiinimäärää. Vivaspin-suodatus sen sijaan vähensi proteiinipitoisuutta noin viidesosaan verrattuna suodattamattomaan plasmaan. Proteiinipitoisuustulokset eivät kuitenkaan ole täysin loogisia: suodatuksessa 2 Sertolab-suodatetun plasman proteiinipitoisuus on suurempi kuin suodattamattoman plasman. Tämä johtuu todennäköisesti määrittämisessä käytettyjen suurten laimennoksien aiheuttamasta vaihtelusta tai suodatetun plasman tilavuuden vaihtelusta.

Varsinaisen proteiiniprofiilin vastaavuus tarkistettiin SDS-PAGE:lla ja SEC:llä. Suodattamattoman ja suodatettujen plasmojen SEC-kromatogrammit (kuva 8) näyttävät proteiinin määrän

näytteissä aallonpituudella 215 nm. Suodattamattoman ja Sertolab-suodatetun plasman kuvaajat ovat lähes identtiset, ja päällekkäin asetettuna (kuva 8 D) ne lähestulkoon peittävät toisensa. Tämä kertoo siitä, että Sertolab-suodatus ei muuttanut plasman proteiineja tai niiden määrää. Vivaspin-suodatetun plasman kuvaajan absorbanssi taas on huomattavasti pienempi. Koska proteiinin absorbanssi on suhteessa proteiinin määrään (Noble ja Bailey 2009), tämä kertoo siitä, että näytteessä on vähemmän proteiinia, mikä on yhteneväistä kolorimetrisesti määritettyjen proteiinipitoisuuksien kanssa (taulukko 5). Muodoltaan Vivaspin-suodatetun plasman kuvaaja on kuitenkin yhteneväinen muiden kuvaajien kanssa, mikä viittaa siihen, että näytteissä on samankokoisia proteiineja.

Plasma-näytteiden SDS-PAGE-ajo tuotti identtiset ajokuvaajat kaikista kolmesta näytteestä (kuva 7), mistä voidaan päätellä, että näytteiden proteiinkoostumukset olivat samanlaiset. Vivaspin-suodatettu plasma vaikuttaa siis vastaavan proteiiniprofiililtaan suodattamatonta plasmaa, joten sen käyttö proteiinikoronakokeissa oli perusteltua. SEC-analyysi sekä proteiininpitoisuusmääritys viittaavat siihen, että Vivaspin-suodatus vähentää plasman proteiinimäärää, mikä ei kuitenkaan haitannut, sillä proteiinikokeissa ongelmana on usein juuri plasman tuottama liian suuri proteiinitausta.

Vivaspin-suodatetussa plasmassa olevat partikkelit analysoitiin NTA:lla (taulukko 6). Partikkeleita on suhteellisen paljon, mutta niiden halkaisija eroaa huomattavasti työssä käytettyjen EV:iden halkaisijasta (taulukko 4). Partikkelien halkaisija on kuitenkin suurempi kuin Ericksonin määrittämän yhtälön mukaisesti laskettu Vivaspin-suodattimen huokoskoko. Partikkelit eivät kuitenkaan vaikuta olevan EV:itä, sillä suodatetusta plasmasta ei löydy EV-markkereita western blot -analyysissä (kuva 15). Plasmassa olevat partikkelit saattavat siis olla esimerkiksi proteiiniaggregaatteja. Olisi kuitenkin hyvä tarkistaa esimerkiksi western blotilla spesifisillä markkereilla, ovatko partikkelit lipoproteiineja.

7.3 Solunulkoisten vesikkelit jäävät kiinni Vivaspin-suodattimeen

Koska EV:t saattavat jäädä kiinni suurimolekyylisuuruisiin suodatinmateriaaleihin, testattiin, jäisivätkö ne kiinni Vivaspin-suodattimiin. PBS:llä laimennettua EV-kantaliuosta suodatettiin Vivaspin-suodattimen läpi, suodattimeen jäänyt liuos kerättiin talteen ja suodatin pestiin useaan kertaan. Vain pieni osa Vivaspin-suodattimeen laitetusta EV-liuoksesta saatiin kerättyä pois

suodattimelta (kuva 9). Tästä on pääteltävissä, että huomattava osa EV:stä jää kiinni suodattimeen.

Tutkimuksissa on todettu, että jo 0.125 % SDS-liuos hajottaa sekä mikroversikkelit että eksosomit (Osteikoetxea ym. 2015). Työssä käytetyn Pierce BCA Protein Assay -testin ohjeissa taas suositellaan käyttämään 2 % SDS:ää näytteiden lipidien hajottamiseksi (Morton ja Evans 1992), joten Vivaspin-proteiinikoronakokeissa päätettiin käyttää 2 % SDS:ää EV:iden irrottamiseksi suodattimesta.

7.4 Vivaspin-ultrafiltraatiolla ei pystytty eristämään proteiinikoronaa

Seuraavaksi testattiin, saataisiinko Vivaspin-suodattimen avulla EV:t ja niiden proteiinikorona erotettua plasman vapaista proteiineista. EV:itä inkuboitii PBS:llä laimennetun plasman kanssa, jonka jälkeen näytettä pestiin useita kertoja, jotta plasman vapaat proteiinit saataisiin pois näytteestä. Plasmainkuboidun EV-näytteen lisäksi vastaavalla tavalla käsiteltiin EV-kontrolli EV-0, plasmakontrolli P-0 sekä kaksi eri nanopartikkelistandardia. Nanopartikkelistandardeilla oli tarkoitus nähdä muodostaako plasma erilaisen proteiinikoronan eri partikkeleiden pintaan.

Näytteiden proteiiniakoostumusta tarkasteltiin SDS-PAGE-geelillä (kuva 10). EV-kontrollina toimiva EV-0-näyte oli proteiinimäärältään niin laimea, ettei siitä saatu näytettä SDS-PAGE-geelille. Suodatettu plasma muodosti paljon proteiinivyöhykkeitä geelille. Tämä oli odotettavissa, sillä plasma on erittäin proteiinirikasta. Vivaspin-näytteissä (EV-P, N-P, S-P ja P-0) on nähtävissä paljon samoja proteiinivyöhykkeitä kuin suodatetussa plasmassa. Kaikki näytteiden proteiinivyöhykkeet eivät kuitenkaan ole samoja kuin plasmassa. Tämä kertoo siitä, että Vivaspin-pesujen aikana tietyt proteiinit poistuivat näytteestä, ja jotkin rikastuivat näytteeseen. Plasmakontrollin P-0 ja EV-P:n sekä nanopartikkelistandardien välillä on kuitenkin vaikea nähdä huomattavaa eroa. Tämä viittaa siihen, että Vivaspin-suodattimeen jäivät samat proteiinit riippumatta siitä, mikä näyte oli kyseessä. Vaikuttaa siis siltä, että SDS-PAGE-geelillä näkyvät proteiinivyöhykkeet johtuvat lähinnä suodattimeen tarttuneista proteiineista (plasmatausta, P-0). EV-P-näytteessä ei juurikaan näy EV-kantaliuoksessa olevia proteiinivyöhykkeitä. Myös se, ettei EV-0-näytettä saatu näkymään geelillä viittaa siihen, ettei Vivaspin-suodatettujen EV-näytteiden proteiinimäärä ollut riittävän suuri siihen, että ne pystyisivät erottumaan plasman

tuottamasta suuresta proteiinitaustasta. Vivaspin-suodatettujen EV:iden huono näkyminen geelillä saattoi myös johtua siitä, ettei niiden irrottaminen SDS:llä suodattimesta ollut tarpeeksi tehokasta. EV:iden irrottaminen SDS-liuoksella lisää näytteiden tilavuutta, jolloin näyte laimeenee, mikä saattaa ainakin osittain selittää näytteiden alhaista proteiinimäärää.

Samoista näytteistä ajettu western blot -analyysi (kuva 11) tuotti epäloogisia tuloksia. EV:iden western blot -analyysissä solulysaatti toimii positiivisena kontrollina, josta nähdään ovatko analyysissä käytetyt vasta-aineet toimineet. Varsinaisten EV-näytteiden pitäisi antaa signaali, kun taas muiden EV-vapaiden näytteiden ei pitäisi näkyä kalvolla. Solulysaatti antoi selkeän signaalin HSP70:lle ja tubuliinille. Kaikki muut näytteet antoivat vaimean signaalin näille vasta-aineille. Signaali on huomattavasti heikompi kuin solulysaatilla, mutta silti erotettavissa. Kaikissa proteiinikoronanäytteissä oli vahvat proteiinivyöhykkeet juuri HSP70 ja tubuliinin kohdilla (70 ja 55 kDa) kuten aiemmassa SDS-PAGE geelistä (kuva 10) oli nähtävissä. Vaikuttaa siis siltä, että käsittely aiheutti vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista western blot -kalvolle. EV-P-näytteen pitäisi antaa positiivinen tulos käytetyille vasta-aineille. Vahvan signaalin puuttuminen tukee aiempaa johtopäätöstä siitä, että Vivaspin-suodatettujen EV-näytteiden proteiinipitoisuus oli liian alhainen. TSG101-vasta-aine ei toiminut kalvolla lainkaan.

Vivaspin-suodatus ei siis ollut tarpeeksi tehokas tapa erottamaan plasman vapaita proteiineja proteiinikoronasta. Sekä EV:t että plasmaproteiinit vaikuttivat tarttuvan suodattimeen, mikä aiheutti ongelmia näytteiden jatkokäsittelyssä. Erityisesti vapaiden plasmaproteiinien aiheuttama suuri proteiinitausta esti pelkän proteiinikoronan tarkastelun. Jotta EV:t saataisiin näkyviin geeleissä, täytyisi EV:itä laittaa suodattimeen huomattavasti paljon enemmän, mikä taas ei ole tarkoituksenmukaista. Vivaspin-suodatukseseen kului myös runsaasti aikaa, mikä saattaa vaikuttaa proteiinikoronan koostumukseen. Vapaiden proteiinien poistamiseksi proteiinikoronanäytteestä täytyi siis keksiä jokin tehokkaampi keino.

7.5 Geelifiltraatio toimi paremmin EV:iden proteiinikoronan eristämiseen

EV-P, EV-0 ja P-0 -näytteiden SEC-ajoista piirrettiin kromatogrammit (kuva 12). Ensimmäinen EV-P ja EV-0-näytteissä näkyvä piikki on EV-piikki, sillä EV:t eluoituvat ensimmäisenä ulos SEC-pylvästä. P-0-kuvaaja (kuva 12 C) kuvaa vapaita plasmaproteiineja. EV-piikki erottuu

melko hyvin plasmaproteiineista EV-P-kuvaajassa (kuva 12 A), mutta piikit menevät kuitenkin hiukan päällekkäin. Vapaiden plasmaproteiinien osalta EV-P:n ja P-0:n kuvaajat ovat täysin toisiaan vastaavat.

Kaikista SEC-ajoista kerättiin 2 ml:n suuruiset näytteet EV-piikin kohdalta. Näytteet konsentroitiin ja niiden proteiiniprofiili analysoitiin SDS-PAGE:lla. SEC-käsitelty proteiinikoronanäytteet näyttävät johdonmukaisilta (kuva 13 ja 14): EV-0-näytteen muodostamat proteiinivyöhykkeet muistuttavat selkeästi EV-kantaliuosta. P-0-näyte muistuttaa plasmaa, mutta siinä näkyy vain osa plasman proteiinivyöhykkeistä, sillä käytetyssä SEC-fraktiossa oli ollut mukana vain osa plasman proteiineista. EV-P:n muodostamissa proteiinivyöhykkeissä on yhteneväisyyksiä sekä EV-0 että P-0-näytteiden kanssa. Tämä viittaa siihen, että SEC-ajosta saatiin eristettyä EV:t niiden proteiinikoronan kanssa.

SEC-näytteistä tehty western blot -analyysi (kuva 15) näyttää johdonmukaiselta. Sekä EV-kantaliuos että solulysaatti antoivat signaalin HSP70:lle ja tubuliinille. EV-0 ja EV-P antavat signaalin vain HSP70:lle. Sekä P-0- että suodattamaton plasma -näyte eivät antaneet mitään signaalia. Nämä näytteet toimivat negatiivisena kontrollina, eikä niiden odotettukaan antavan signaalia western blot -kalvolla. TSG101-vasta-aine ei toiminut analyysissä.

SEC-ajojen näytteiden tiedot kerättiin yhteen (taulukko 7). EV-näytteiden koot ovat yhdenmukaisia EV-kantaliuosten kanssa. EV-P ja EV-0 -näytteiden EV-saannot ovat samaa suuruusluokkaa, ja ne ovat suuremmat kuin P-0 ja EV-0_taista -näytteillä, kuten oli odotettavissa. EV-näytteiden partikkelien saanto SEC-ajon jälkeen oli keskimäärin vain noin 30 %. Hävikki johtuu osittain siitä, että 2 ml:n keräysfraktiot eivät aina osuneet täysin kohdakkain EV-piikin kanssa. Myös se, että SEC-fraktiot täytyi konsentroida ennen jatkokäsittelyä, saattoi aiheuttaa EV-hävikkiä.

SEC-käsittelyn jälkeen näytteissä olevat proteiinipitoisuudet (taulukko 7) ovat melko pieniä verrattuna lähtötilanteeseen (taulukko 4). EV-kantaliuoksen proteiinipitoisuus oli keskimäärin 0.5 µg/µl, kun SEC käsittelyn jälkeen se oli keskimäärin 0.1 µg/µl EV-0 -näytteissä ja 0.2 µg/µl EV-P -näytteissä. Vaikuttaa siis siltä, että SEC-ajo vähensi näytteiden proteiinimäärää, vaikka EV-P -näytefraktioon tuli EV-piikin kohdalta aina mukaan hiukan myös vapaita plasmaproteiineja. Yleisesti katsottuna proteiinipitoisuudet ovat kuitenkin näytteiden kannalta suurimmaksi

osaksi loogisia: Eri ajojen tulokset eivät kuitenkaan ole yhtenäisiä, joten menetelmää täytyisi vielä kehittää ja yhtenäistää, jotta tuloksista voitaisiin tehdä luotettavia johtopäätöksiä.

Yleisesti ottaen EV-proteiinikorona-kompleksin erottaminen vapaista plasmaproteiineista onnistui paremmin SEC:llä kuin Vivaspin-suodatuksella: sekä SDS-PAGE- että western blot -analyysit ovat yhdenmukaisia, ja tukevat ajatusta siitä, että EV:t olisi onnistuttu eristämään yhdessä proteiinikoronan kanssa. EV-piikkiä ei kuitenkaan täysin saatu erilleen vapaiden plasmaproteiinien piikeistä. SEC-pylvään resoluutiota parantamalla saattaisi olla mahdollista saada piikit täysin erilleen toisistaan.

7.6 Yleistä pohdintaa geelifiltraatiosta

Useissa tutkimuksissa on todettu, että SEC-geelifiltraatio on tehokas ja hyvä menetelmä erottamaan EV:t fysiologisten näytteiden vapaista proteiineista (Böing ym. 2014; Gámez-Valero ym. 2016; Monguió-Tortajada ym. 2019). SEC:n käyttämisen etuina verrattuna esimerkiksi ultrasentrifugaatioon ovat nopeus, yksinkertaisuus, tehokkuus ja alhainen hinta. Tässä projektissa käytettiin automatisoitua SEC-koneistoa, jonka avulla näytteiden absorbanssi tallentuu ja visualisoituu automaattisesti, mikä parantaa tulosten yhtenäisyyttä ja vapauttaa käyttäjän käytännön välivaiheista. SEC-pylväät on myös mahdollista pestä tai autoklavoida ja käyttää uudelleen.

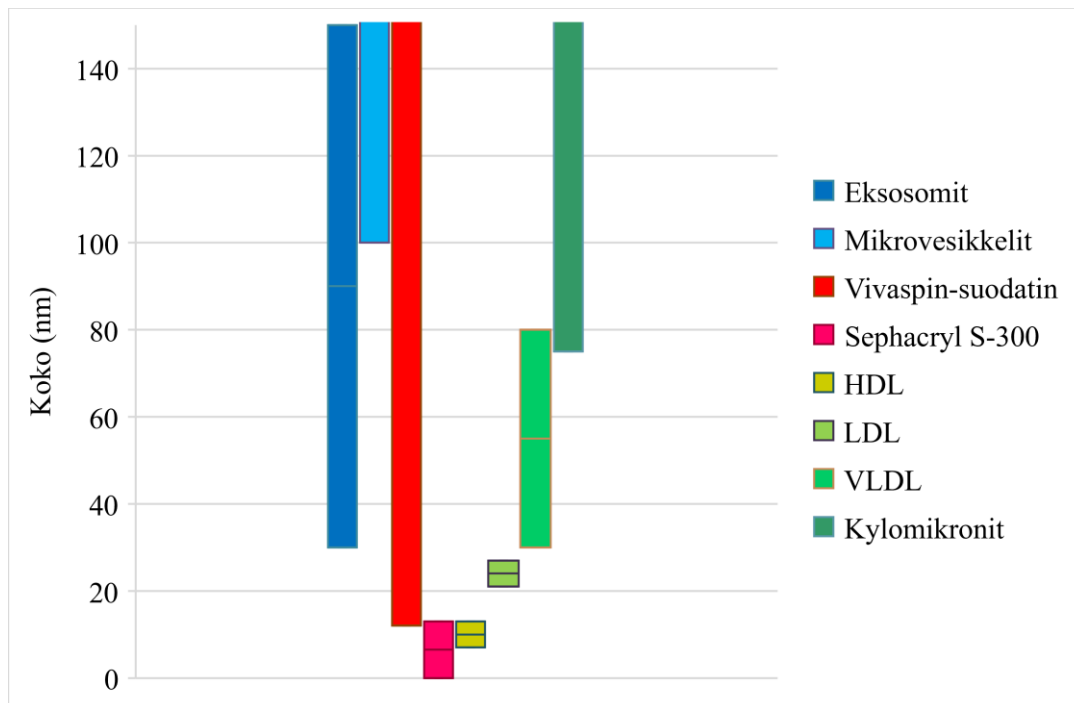
Kun EV:itä halutaan eristää plasmasta, yleisimpiä plasmasta tulevia kontaminantteja ovat veren lipoproteiinit (Yuana ym. 2014; Södar ym. 2016; Karimi ym. 2018): Kylomikronit, VLDL ja LDL muistuttavat EV:itä kokonsa puolesta (Feingold ja Grunfeld 2000). Plasman HDL taas eristyy EV:iden mukana herkästi EV:itä muistuttavan tiheydensä ansiosta (Feingold ja Grunfeld 2000, Yuana ym. 2014). SEC-materiaaleja ajateltaessa paras hiukkaskoko olisi sellainen joka erottelisi EV:itä mahdollisimman spesifisesti. Kuten aiemmin on mainittu, mikrovesikkelien ja eksosomien koko vaihtelee välillä 30-1000 nm (van der Pol ym. 2012; Szatanek ym. 2017). Pelkällä SEC:llä optimaalinen matriisi siis sitoisi HDL:ää ja LDL:ää, mutta päästäisi EV:t läpi, jolloin EV:t eluoituvat pylvästä ulos ensimmäisenä yhdessä VLDL:n ja kylomikronien kanssa (taulukko 8 ja kuva 11). EV:iden erottaminen VLDL:stä ja kylomikroneista normaalin SEC:n avulla olisi mahdotonta niiden samanlaisen kokoluokan vuoksi.

Taulukko 8. Verenlipoproteiinit ja niiden koot (Yuana ym. 2014; Sòdar ym. 2016; Karimi ym. 2018).

Lipoproteiini	Halkaisija (nm)
HDL	5-12
LDL	18-25
VLDL	30-80
Kylomikroni	75-1200

Tässä tutkimuksessa plasman Vivaspín-suodatuksella päästään ainakin teoriassa eroon kylomikroneista, VLDL:stä sekä LDL:stä, sillä niiden ei pitäisi päästä läpi 12 nm:n hiukkaskoon suodattimesta (kuva 16). Työssä käytetty SEC-materiaali, Sephacryl S-300, taas sitoo 13 nm kokoisia partikkeleita, jolloin pienikokoisen HDL:n pitäisi sitoutua SEC-matriisiin. Tällöin SEC-erottelun jälkeen EV:iden pitäisi olla täysin vapaita plasman lipoproteiineista.

SEC-materiaaleista Sepharose CL-2B (erottelukyky 70-40000 kDa), sitoo 75 nm kokoisia partikkeleita, ja se on yleisesti käytetty SEC-matriisi (Karimi ym. 2018; Monguió-Tortajada ym. 2019). Sen hiukkaskoko sitoo itseensä kuitenkin myös osan pienistä EV:istä. Sepharose CL-2B:hen verrattuna tässä työssä käytetty Sephacryl S-300 (erottelukyky 10-1500 kDa), joka sitoo 13 nm kokoisia partikkeleita, erottelee huomattavasti pienempiä proteiineja ja hiukkasia. Ajatuksena oli saada kaikki EV:t eluoitumaan yhtenäisenä fraktion, sekä erottaa EV:t plasmassa olevasta albumiinista ja lipoproteiineista. Tätä ei kuitenkaan pystytty täysin saavuttamaan näillä kokeilla ja materiaaleilla.



Kuva 16. Kokoverailua EV:iden, Vivaspin suodattimen hiukkaskoon, Sephacryl SEC-materiaalin ja plasmassa olevien lipoproteiinien välillä. Vivaspin-pylväs kuvaa sitä, minkä kokoiset partikkelit jäävät 1000 kDa -suodattimeen. Sephacryl S-300 -pylväs kuvaa sitä, minkä kokoisia partikkeleita geelimateriaali hidastaa SEC:n aikana. Kuvaaja on katkaistu kokoluokasta 140 nm, sillä olennaisimmat kokovaihtelut ovat välillä 0-100 nm. HDL, LDL, VLDL ja kylomikronit ovat plasman lipoproteiineja (Feingold ja Grunfeld 2000).

8 YHTEENVETO

Tutkimuksessa testattiin kahta eri menetelmää EV:iden proteiinikoronan eristämiseksi: ultrafiltraatiota ja geelifiltraatiota. Tärkeimpänä tavoitteena oli saada EV-proteiinikorona -kompleksi erotettua verioplasmaliuoksen vapaista plasmaproteiineista. Tätä testattiin ensin Vivaspin-ultrafiltraatiolla, jolloin vapaista plasmaproteiineista pyrittiin pääsemään eroon useilla pesuilla. Tulokset näyttivät kuitenkin siltä, että niin EV:t kuin plasman proteiinit jäivät kiinni suodattimeen, jolloin proteiinikoronan havaitseminen näytteistä ei ollut mahdollista. Seuraavaksi testattiin olisiko geelifiltraatiolla mahdollista saada EV-proteiinikorona-kompleksi ja vapaat plasmaproteiinit erotettua toisistaan. Käytetyllä Sephacryl S-300 -geelimateriaalilla ei saatu EV:itä ja plasmaproteiineja erotettua täysin toisistaan. SEC-ajojen proteiiniabsorbanssi-kuvaajista oli nähtävissä, että EV-piikki eluoitui hiukan limittäin plasman proteiinipiikkien kanssa. SEC-ajojen EV-fraktioiden proteiinianalyysit vaikuttivat kuitenkin lupaavammilta kuin Vivaspin-kokeessa: SEC-näytteistä oli mahdollista nähdä eroavaisuuksia EV-proteiinikorona-näytteen sekä EV- ja plasmakontrollin välillä SDS-PAGE:lla.

Vaikka SEC ei onnistunut täysin erottamaan proteiinikorona-EV:itä plasman vapaista proteiineista, menetelmän etuna ovat sen helppous, toistettavuus ja automatisoitavuus. Mikäli menetelmää onnistuttaisiin optimoimaan niin, että EV-piikki ja vapaiden plasmaproteiinien piikki saataisiin erotettua selkeästi toisistaan, olisi menetelmän jatkojalostus ja automatisointi suhteellisen helppoa.

Myöhemmin EV:iden proteiinikoronan proteiinien yksityiskohtainen tarkastelu vaatisi massaspektrometristä analyysiä. Lisäksi olisi mielenkiintoista selvittää, eristääkö SEC vesikkeleiden kovan vai pehmeän proteiinikoronan. Tätä olisi mahdollista tutkia mm. tarkastelemalla partikkelien ympärysmitan (proteiinikoronan) kasvua DLS:llä. Kokeissa on käytetty poolattua EV-kantaliuosta, joka sisältää sekä eksosomeja että mikrovesikkeleitä. Kun menetelmää on saatu kehitettyä pidemmälle, tulisi nämä kaksi vesikkeliryhmää erottaa toisistaan ja menetelmä optimoida kummallekin vesikkeliryhmälle erikseen. EV:istä olisi hyvä selvittää myös useampia positiivisia proteiinimarkkereita ja vähintään yksi negatiivinen proteiinimarkkeri.

Tämä tutkimus tarjoaa lähinnä esitestauksia mahdollista menetelmistä EV:iden proteiinikoronan eristämiseen. Kokeet on toistettu vain muutamaan kertaan, eivätkä kaikki tulokset ole yhdenmukaisia keskenään. Jatkossa muun muassa kokeissa käytettyjen EV:iden määrä tulisi optimoida ja yhtenäistää. Menetelmää tulisi vielä kehittää pidemmälle ja kokeet toistaa useampaan kertaan, jotta tuloksista voitaisiin tehdä luotettavia johtopäätöksiä.

9 KIITOKSET

Erityisesti haluaisin kiittää ohjaajiani Marjo Yliperttula ja Heikki Saarta. Suurkiitos myös kaikille muille biofarmasian tutkimusryhmän jäsenille, erityisesti Jacopo Zinille, Olli-Petteri Nivarolle ja Leena Pietilälle jatkuvasta opastuksesta ja kärsivällisyydestä.

Haluaisin kiittää myös Pia Siljanderia hyvistä neuvoista sekä EV Core-yksikköä laitteistojen lainasta.

Armstrong J., Stevens M. 2018: Strategic design of extracellular vesicle drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 130: 12-16. doi: 10.1016/j.addr.2018.06.017.

Böing A., van der Pol E., Grootemaat A., Coumans F., Sturk A., Nieuwland R. 2014: Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of extracellular vesicles* 3. doi: 10.3402/jev.v3.23430.

Cantin R., Diou J., Bélanger D., Tremblay A., Gilbert C. 2008: Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. *Journal of immunological methods* 338 (1-2): 21-30. doi: 10.1016/j.jim.2008.07.007.

Caracciolo G., Palchetti S., Digiaco L., Chiozzi R., Capriotti A. 2018: Human Biomolecular Corona of Liposomal Doxorubicin: The Overlooked Factor in Anticancer Drug Delivery. *ACS applied materials & interfaces* 10 (27): 22951-22962. doi: 10.1021/acsami.8b04962.

Choi D., Kim D., Kim Y., Ghoo Y. 2015: Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass spectrometry reviews* 34 (4): 474-90. doi: 10.1002/mas.21420.

Coumans F., Brisson A., Buzas E., Dignat-George F., Drees E., El-Andaloussi S., Emanuelli C., Gasecka A., Hendrix A., Hill A., Lacroix R., Lee Y., van Leeuwen T., Mackman N., Mäger I., Nolan J., van der Pol E., Pegtel D., Sahoo S., Siljander P., Sturk G., de Wever O., Nieuwland R. 2017: Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation research* 120 (10): 1632-1648. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309417.

Cvijetkovic A., Lötvall J., Lässer C. 2014: The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 3. doi: 10.3402/jev.v3.23111.

Dragovic R., Gardiner C., Brooks A., Tannetta D., Ferguson D., Hole P., Carr B., Redman C., Harris A., Dobson P., Harrison P., Sargent I. 2011: Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis *Nanomedicine* 7 (6): 780-8. doi: 10.1016/j.nano.2011.04.003.

Erickson H. 2009: Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological procedures online* 11: 32-51. doi: 10.1007/s12575-009-9008-x.

Ezrahi S., Aserin A., Garti N. 2019: Basic principles of drug delivery systems - the case of paclitaxel. *Advances in colloid and interface science* 263: 95-130. doi: 10.1016/j.cis.2018.11.004.

Feingold K. ja Grunfeld C. In: Feingold K, Anawalt B., Boyce A., Chrousos G. ym. (toim.). 2000 (viimeisin päivitys 2018): Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext [Internet]: MDText.com, Inc, South Dartmouth (MA) (<https://www.endotext.org/>) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/> , luettu 4.11.2019.

Gámez-Valero A., Monguió-Tortajada M., Carreras-Planella L., Franquesa M., Beyer K., Borràs F. 2016: Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. Scientific reports 6: 33641. doi: 10.1038/srep33641.

Jang S., Kim O., Yoon C., Choi D., Roh T., Park J., Nilsson J., Lötval J., Kim Y., Ghoo Y. 2013: Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. American Chemical Society Nano 7 (9): 7698-7710. doi: 10.1021/nn402232g.

Kaighn M., Narayan K., Ohnuki Y., Lechner J., Jones L. 1979: Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Investigative urology 17 (1): 16-23.

Kailashiya J., Gupta V., Dash D1. 2019: Engineered human platelet-derived microparticles as natural vectors for targeted drug delivery. Oncotarget 10 (56): 5835-5846. doi: 10.18632/oncotarget.27223.

Karimi N., Cvjetkovic A., Jang S., Crescitelli R., Hosseinpour Feizi M., Nieuwland R., Lötval J., Lässer C. 2018: Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. Cellular and molecular life sciences 75 (15): 2873-2886. doi: 10.1007/s00018-018-2773-4.

Kobayashi M., Salomon C., Tapia J., Illanes S., Mitchell M., Rice G. 2014: Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200. Journal of translational medicine 12: 4. doi: 10.1186/1479-5876-12-4.

Leibe R., Hsiao I., Fritsch-Decker S., Kielmeier U., Wagbo A., Voss B., Schmidt A., Hessman S., Duschl A., Oostingh G., Diabaté S., Weiss C. 2019: The protein corona suppresses the cytotoxic and pro-inflammatory response in lung epithelial cells and macrophages upon exposure to nanosilica. Archives of toxicology 93 (4): 871-885. doi: 10.1007/s00204-019-02422-9.

Li J., Sherman-Baust C., Tsai-Turton M., Bristow R., Roden R., Morin P. 2009: Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. BioMed Central cancer 9: 244. doi: 10.1186/1471-2407-9-244.

Lundqvist M., Stigler J., Cedervall T., Bergga T., Flanagan M., Lynch I., Elia G., Dawson K. 2011: The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. American Chemical Society nano 5 (9): 7503-9. doi: 10.1021/nn202458g.

Lötvall J., Hill A., Hochberg F., Buzás E., Di Vizio D., Gardiner C., Ghossein Y., Kurochkin I., Mathivanan S., Quesenberry P., Sahoo S., Tahara H., Wauben M., Witwer K., Théry C. 2014: Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 3: 26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913.

Monguió-Tortajada M., Gálvez-Montón C., Bayes-Genis A., Roura S., Borràs F. 2019: Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cellular and molecular life sciences* 76(12): 2369-2382. doi: 10.1007/s00018-019-03071-y.

Morton R ja Evans T. 1992: Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Analytical biochemistry* 204 (2): 332-4. doi: 10.1016/0003-2697(92)90248-6.

Murugadoss S., Lison D., Godderis L., Van Den Brule S., Mast J., Brassinne F., Sebaihi N., Hoet P. 2017: Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Archives of toxicology* 91 (9): 2967-3010. doi: 10.1007/s00204-017-1993-y.

Nierenberg D., Khaled A., Flores O. 2018: Formation of a protein corona influences the biological identity of nanomaterials. *Reports of practical oncology and radiotherapy* 23 (4): 300-308. doi: 10.1016/j.rpor.2018.05.005.

Noble J., Bailey M. 2009: Quantitation of protein. *Methods in enzymology* 463: 73-82. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1.

O'Brien M., Wigler N., Inbar M., Rosso R., Grischke E., Santoro A., Catane R., Kieback D., Tomczak P., Ackland S., Orlandi F., Mellars L., Alland L., Tendler C; CAELYX Breast Cancer Study Group. 2004: Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of oncology* 15 (3): 440-9. doi: 10.1093/annonc/mdh097.

Osteikoetxea X., Sódar B., Németh A., Szabó-Taylor K., Pálóczi K., Vukman K., Tamási V., Balogh A., Kittel Á., Pállinger É., Buzás E. 2015: Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Organic & biomolecular chemistry* 13 (38): 9775-82. doi: 10.1039/c5ob01451d.

Palchetti S., Caputo D., Digiacomo L., Capriotti A., Coppola R., Pozzi D., Caracciolo G. 2019: Protein Corona Fingerprints of Liposomes: New Opportunities for Targeted Drug Delivery and Early Detection in Pancreatic Cancer. *Pharmaceutics* 11 (1). doi: 10.3390/pharmaceutics11010031.

Pederzoli F., Tosi G., Vandelli M., Belletti D., Forni F., Ruozzi B. 2017: Protein corona and nanoparticles: how can we investigate on? Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology 9 (6). doi: 10.1002/wnan.1467.

Saari H., Lázaro-Ibáñez E., Viitala T., Vuorimaa-Laukkanen E., Siljander P., Yliperttula M. 2015: Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. Journal of controlled release 220 (Pt B): 727-37. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.031.

Sódar B., Kittel Á., Pálóczi K., Vukman K., Osteikoetxea X., Szabó-Taylor K., Németh A., Sperlágh B., Baranyai T., Giricz Z., Wiener Z., Turiák L., Drahos L., Pállinger É., Vékey K., Ferdinandy P., Falus A., Buzás E. 2016: Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. Scientific reports 6: 24316. doi: 10.1038/srep24316.

Szatanek R., Baj-Krzyworzeka M., Zimoch J., Lekka M., Siedlar M., Baran J. 2017: The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. International journal of molecular sciences 18 (6). doi: 10.3390/ijms18061153.

Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. 2006: Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Current protocols in cell biology: kappale 3: yksikkö 3.22.1. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.

Théry C., Witwer K., Aikawa E., Alcaraz M., Anderson J., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G. ym. 2018: Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines. Journal of extracellular vesicles 7 (1), 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.

Vallabhajosyula P., Korutla L., Habberthuer A., Yu M., Rostami S., Yuan C., Reddy S., Liu C., Korutla V., Koeberlein B., Trofe-Clark J., Rickels M., Naji A. 2017: Tissue-specific exosome biomarkers for noninvasively monitoring immunologic rejection of transplanted tissue. The Journal of clinical investigation 127 (4): 1375-1391. doi: 10.1172/JCI87993.

van der Pol E., Böing A., Harrison P., Sturk A., Nieuwland R. 2012 Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. Pharmacological reviews 64 (3): 676-705. doi: 10.1124/pr.112.005983.

Webber J., Clayton A. 2013: How pure are your vesicles? Journal of extracellular vesicles 2. doi: 10.3402/jev.v2i0.19861.

Weber C., Simon J., Mailänder V., Morsbach S., Landfester K. 2018: Preservation of the soft protein corona in distinct flow allows identification of weakly bound proteins. Acta biomaterialia 76: 217-224. doi: 10.1016/j.actbio.2018.05.057.

Yong T., Zhang X., Bie N., Zhang H., Zhang X., Li F., Hakeem A., Hu J., Gan L., Santos H., Yang X. 2019: Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. *Nature communications* 10 (1): 3838. doi: 10.1038/s41467-019-11718-4.

Yuana Y., Levels J., Grootemaat A., Sturk A., Nieuwland R. 2014: Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *Journal of extracellular vesicles* 3. doi: 10.3402/jev.v3.23262.

Zhuang X., Xiang X., Grizzle W., Sun D., Zhang S., Axtell R., Ju S., Mu J., Zhang L., Steinman L., Miller D., Zhang H. 2011: Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular therapy* 19 (10): 1769-79. doi: 10.1038/mt.2011.164.

Zhang Z., Guan J., Jiang Z., Yang Y., Liu J., Hua W., Mao Y., Li C., Lu W., Qian J., Zhan C. 2019: Brain-targeted drug delivery by manipulating protein corona functions. *Nature communications* 10 (1): 3561. doi: 10.1038/s41467-019-11593-z.